

# PATENT COOPERATION TREATY

WO 02/12521  
PCT/JP00/05214

PCT

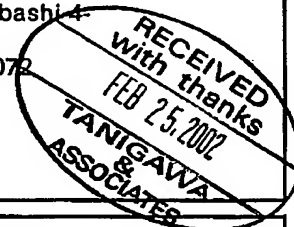
NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TANIGAWA, Hidejiro  
Tanigawa And Associates, Patent  
Firm  
6F, Iwata Bldg., 5-12, Iidabashi 4-  
chome  
Chiyoda-ku, Tokyo 102-0072  
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 14 February 2002 (14.02.02)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 00PF209-PCT			
International application No. PCT/JP00/05214	International filing date (day/month/year) 03 August 2000 (03.08.00)	Priority date (day/month/year)	
Applicant JAPAN TOBACCO INC. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

KP, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EA, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 14 February 2002 (14.02.02) under No. WO 02/12521

## REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

## REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and the PCT Applicant's Guide, Volume II.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.91.11



## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 書類記号 00PF209-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05214	国際出願日 (日.月.年) 03.08.00	優先日 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) 日本たばこ産業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。





A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N 15/84, 5/14, A01H 1/00, 5/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12N 15/00-15/90, A01H 1/00-15/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル(JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-179174, A(北興化学工業株式会社) 7. 7月. 1998(07. 07. 98) (ファミリーなし)	1-25
A	WO, 00/37663, A2(THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION, INC.) 29. 6月. 2000(29. 06. 00) & AU, 200025943, A	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
17. 10. 00	24.10.00	
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	
日本国特許庁 (ISA/J P)	内田 俊生	
郵便番号 100-8915	4 N 2937	
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101 内線 3488	



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TRICK, H. N. et al. "SAAT:sonication-assisted <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation.", Transgenic Research (Sept., 1997) Vol. 6, No. 5, p. 329-336	1-25
A	US, 5231019, A (CIBA-GEIGY CORPORATION) 27. 7月. 1993 (27. 07. 93) & JP, 2000-078926, A & JP, 60-251887, A & GB, 2159173, A & US, 5453367, A & EP, 164575, A1 & EP, 429093, A2	1-25
A	HORSCH, R. B. et al. "A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants.", Science (Mar. 8, 1985) Vol. 227, No. 4691, p. 1229-1231	1-25





## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10179174 A**(43) Date of publication of application: **07 . 07 . 98**

(51) Int. Cl.

**C12N 15/09**  
**A01H 1/00**  
**/(C12N 15/09 , C12R 1:91 )**

(21) Application number: **09295569**(22) Date of filing: **28 . 10 . 97**(30) Priority: **08 . 11 . 96 JP 08296809**(71) Applicant: **HOKKO CHEM IND CO LTD**(72) Inventor: **YAMAGUCHI MASANORI**  
**TERAKAWA TERUHIKO**(54) **TRANSFORMATION OF PLANT AND PRODUCTION OF TRANSGENIC PLANT**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a process for the transformation of a plant and the production of a transgenic plant in high transforming ratio.

**SOLUTION:** A transgenic plant is produced by the following steps (a) to (d). (a) A step to disperse plant cells or a tissue containing plant cells together with a

foreign gene and a whisker in a liquid, (b) a step to centrifuge the dispersion to effect the adhesion of the whisker to the plant cell, (c) a step to apply ultrasonic wave to the product of the step (b) to effect the vibration of the whisker to form a hole on the plant cell and introduce the foreign gene through the hole into the plant cell and (d) a step to regenerate a plant from the plant cell containing foreign gene introduced in the step (c) or from a plant tissue containing the cell.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-179174

(43)公開日 平成10年(1998)7月7日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 0 1 H 1/00		A 0 1 H 1/00	A
// (C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:91)			

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 10 頁)

(21)出願番号	特願平9-295569	(71)出願人	000242002 北興化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本石町4丁目4番20号
(22)出願日	平成9年(1997)10月28日	(72)発明者	山口 将憲 神奈川県座間市栗原1277-1 相武台ホワ イトレジデンスB102
(31)優先権主張番号	特願平8-296809	(72)発明者	寺川 輝彦 神奈川県厚木市森の里2-1-6-103
(32)優先日	平8(1996)11月8日	(74)代理人	弁理士 遠山 勉 (外2名)
(33)優先権主張国	日本 (J P)		

(54)【発明の名称】 植物の形質転換方法および形質転換植物の作出方法

(57)【要約】

【課題】 形質転換率の高い、植物の形質転換方法および形質転換植物の作出方法を提供する。

【解決手段】 次の(a)～(d)の各工程により、形質転換植物を作出する。

(a) 植物細胞又は植物細胞を含む組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させる工程、

(b) 工程(a)の後に、遠心処理を行い、前記植物細胞にウイスカを付着させる工程、

(c) 工程(b)の後に、超音波処理を行い、ウイスカを振動させて、前記植物細胞を穿孔せしめ、この孔から細胞中に外来遺伝子を導入する工程。

(d) 工程(c)で外来遺伝子が導入された植物細胞又はこれを含む植物組織から植物体を再生する工程。





## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の(a)～(c)の各工程を含むことを特徴とする植物の形質転換方法。

(a) 植物細胞又は植物細胞を含む組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させる工程、(b) 工程(a)の後に、遠心処理を行い、前記植物細胞にウイスカを付着させる工程、(c) 工程(b)の後に、超音波処理を行い、ウイスカにより、前記植物細胞を穿孔せしめ、この孔から細胞中に外来遺伝子を導入する工程。

【請求項2】 前記外来遺伝子が、塩基性物質と複合体を形成している遺伝子である請求項1記載の方法。

【請求項3】 次の(a)～(d)の各工程を含むことを特徴とする形質転換植物の作出方法。

(a) 植物細胞又は植物細胞を含む組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させる工程、(b) 工程(a)の後に、遠心処理を行い、前記植物細胞にウイスカを付着させる工程、(c) 工程(b)の後に、超音波処理を行い、ウイスカにより、前記植物細胞を穿孔せしめ、この孔から細胞中に外来遺伝子を導入する工程。(d) 工程(c)で外来遺伝子が導入された植物細胞又はこれを含む植物組織から植物体を再生する工程。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、効率のよい植物の形質転換方法および形質転換植物の作出方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】細胞に遺伝子を導入して植物細胞を形質転換し、形質転換植物を得ようとする試みが、いくつか知られている。

【0003】例えば、シリコンカーバイドファイバーなどのウイスカを用いて、植物細胞を液体混合下で激しく混合し、その操作によって穿孔して、外来遺伝子を導入する方法(以下、「ウイスカ法」と略す)(米国特許第5302523号明細書、米国特許第7472538号明細書、Kaepfer, H. F. ら、1992年、「Theoretical and Applied Genetics」、第84巻、560～566頁、Asano, Y. ら、1991年、「Plant Science」、第79巻、247～252頁)、植物細胞に超音波を照射して、細胞を部分的に損傷させ、損傷箇所を通して遺伝子を導入する方法(Joersbo, M. ら、1990年、「Plant Cell Reports」、第9巻、207～210頁、Joersbo, M. ら、1992年、「Physiologia Plantarum」、第85巻、230～234頁)があるが、いずれの方法によっても効率よく形質転換植物は得られていない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】従来のウイスカ法や超

音波法による遺伝子導入方法では、形質転換体は得られ難く、実用的な植物の形質転換方法とは言い難い。

【0005】従って、双子葉および単子葉植物細胞に効率的に遺伝子を導入し、形質転換植物を得る方法の開発が望まれている。

【0006】本発明は、上記の問題点を解決し、形質転換率の高い、植物の形質転換方法および形質転換植物の作出方法を提供することを課題とする。

## 【0007】

10 【課題を解決するための手段】本発明者らは、これらの目的を達成するために鋭意研究した。その結果、植物細胞または植物組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させた状態において、遠心処理ならびに超音波処理を行うことにより、外来遺伝子を細胞内に導入して、外来遺伝子が発現する形質転換細胞を効率よく得て、これを再生することにより、形質転換植物が得られることを見い出した。

20 【0008】すなわち、第1の本発明の要旨とするところは、次の(a)～(c)の各工程を含む、植物の形質転換方法にある。

(a) 植物細胞又は植物細胞を含む組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させる工程、(b) 工程(a)の後に、遠心処理を行い、前記植物細胞にウイスカを付着させる工程、(c) 工程(b)の後に、超音波処理を行い、ウイスカにより、前記植物細胞を穿孔せしめ、この孔から細胞中に外来遺伝子を導入する工程。

30 【0009】また、第2の本発明の要旨とするところは、次の(a)～(d)の各工程を含むことを特徴とする形質転換植物の作出方法にある。

(a) 植物細胞又は植物細胞を含む組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させる工程、(b) 工程(a)の後に、遠心処理を行い、前記植物細胞にウイスカを付着させる工程、(c) 工程(b)の後に、超音波処理を行い、ウイスカにより、前記植物細胞を穿孔せしめ、この孔から細胞中に外来遺伝子を導入する工程。(d) 工程(c)で外来遺伝子が導入された植物細胞又はこれを含む組織から植物体を再生する工程。

## 【0010】

40 【発明の実施の形態】以下に本発明の方法を詳細に説明する。本発明の植物の形質転換方法は、上記(a)～(c)の各工程からなり、本発明の形質転換植物の作出方法は、上記工程にさらに(d)工程を付加したものである。

【0011】以下に、(a)、(b)、(c)、(d)の各工程を詳細に説明する。

## 【0012】〔1〕工程(a) 分散工程

本発明は、植物細胞又は植物組織を、外来の遺伝子とウイスカとともに液体中に均一に分散し、懸濁させた状態にする工程である。



【0013】本発明の方法が適用される植物は特に限定されるものではなく、例えば、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、芝草、その他の単子葉植物、または、タバコ、ダイズ、ワタ、トマト、ハクサイ、キュウリ、レタスなどの双子葉植物などが挙げられる。

【0014】本発明に使用される植物細胞としては、例えば、カルスや懸濁細胞などの脱分化した培養細胞、不定胚、苗条原基などが、植物組織としては、葉、根、茎、胚、生長点などが挙げられるが、好ましくは、カルスおよび懸濁細胞などの植物細胞である。

【0015】また、本発明に用いられる培養細胞は、植物由来のいかなる外殖であつてもよく、例えば、胚盤、生長点、花粉、蒴、葉身、茎、葉柄、根由来のものが挙げられる。

【0016】また、本発明に用いられる培養細胞は、上記した外殖片をカルス形成培地、例えばMS培地(Murashigeら、「Physiologia Plantarum」、1962年、第15巻、473頁～497頁)または、R2培地(Ojimaら、「Plant and Cell Physiology」、1973年、第14巻、1113～1121頁)、N6培地(Chuら、1978年、「In Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking」、43頁～50頁)など、必須成分として無機塩成分およびビタミン類を含む培地に、植物ホルモンとして、例えば、2, 4-PA (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) 0.1～5mg/リットル、ならびに、炭素源として、例えば、ショ糖10～60g/リットル、ゲルライト1～5g/リットルを添加した培地に置床して培養することにより得られる。

【0017】カルス形成培地に外殖片を置床した後、本発明に用いられる培養細胞が得られるまでの培養期間は特に限定されるものではないが、形質転換植物を得ようとする場合には、当該培養細胞からの植物体再生が可能であること、つまり、当該植物細胞が植物体再生能力を保有している期間内であることが重要である。

【0018】また、本発明に用いる培養細胞は植物体再生能力を保有している培養細胞であれば、液体培地による懸濁細胞であつてよい。

【0019】本発明に用いるウイスカ (whisker) とは、微細な針状の構造を持った単結晶をいう。本発明に用いるウイスカとしては、細胞に刺さり、細胞壁を貫いて、細胞表面に孔を形成させ、この孔を経て、外来遺伝子を細胞内に導入することができるものであれば、なんら限定されるものではないが、孔の寸法が細胞の大きさと比較して、大きすぎるものであつてはならない。具体的には、直径が0.01～10μm、好ましくは、0.5～1μm、長さが、1～100μm、好ましくは3～40μmである。ウイスカ材質が、チタン酸カリウム、

炭酸カルシウム、ホウ酸アルミニウム、窒化ケイ素、酸化亜鉛、塩基性硫酸マグネシウム、マグネシア、ホウ酸マグネシウム、二ホウ化チタン、カーボングラファイト、硫酸カルシウム、サファイア、シリコンカーバイドなどが挙げられ、好ましくはチタン酸カリウム、炭酸カルシウム、ホウ酸アルミニウムである。

【0020】本発明に用いるウイスカは、表面処理を行わなくとも単独で使用することもできるが、ウイスカ表面に塩基性官能基を持つウイスカ、好ましくは表面処理剤により表面処理されているウイスカを使用することにより形質転換率を高めることができる。その際の塩基性官能基とは、1～4級アミン類、2価金属錯体などによる塩基性官能基が挙げられるが、好ましくは、アミノ基が用いられる。

【0021】ウイスカ表面への塩基性官能基の付与に用いる化合物は、ウイスカ表面と共有結合できる化合物であれば、特に限定されないが、好ましくは、シランカップリング剤、より好ましくは塩基性官能基を有するシランカップリング剤である。シランカップリング剤としては、3-(2-アミノエトキシ)アミノプロピル-トリメトキシシラン、3-アミノプロピル-トリエトキシシランなどの塩基性シランカップリング剤を挙げることができるが、塩基性官能基を有するシランカップリング剤であれば、これらに限定されるものではない。

【0022】本発明に用いられる外来遺伝子は、植物の形質転換に用いられる核酸であり、DNA、RNAを問わないが、通常はDNAが用いられる。ここで形質転換とは、植物細胞内に遺伝子を導入することをいい、その遺伝子の発現の有無は問わないが、植物細胞内でその遺伝子が安定に保持されることが好ましい。また、遺伝子は、タンパク質もしくはペプチド又はアンチセンスRNA等をコードし、植物細胞内でこれらを発現するものであつてもよいし、染色体中の遺伝子内部に挿入され、その遺伝子の正常な発現を阻害するものであつてもよい。

【0023】本発明に用いられるDNAの形態としては、二本鎖DNA及び一本鎖DNA、環状DNA (プラスミド)、直鎖状DNAのいずれであつてもよい。本発明の遺伝子を植物細胞に導入した後に、その遺伝子を発現させようとする場合には、その遺伝子固有のプロモーター又はターミネーターが機能可能な場合にはそのまま用いてもよいが、植物細胞内で効率よくあるいは特異的に機能するプロモーター又はターミネーターと入れ替えてもよい。

【0024】例えば、植物体内で機能するプロモーターとしてカリフラワーモザイクウイルス由来のCaMV 35Sプロモーター (Ode11ら、1988年、「Plant Mol. Biol.」、第10巻、263～272頁)が挙げられ、ターミネーターとして、カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーターや、アグロバクテリウムのノパリン合成酵素遺伝子由来のターミ



ネーターが挙げられる。

【0025】本発明に用いる外来遺伝子として具体的には、例えば除草剤耐性遺伝子、昆虫耐性遺伝子、ウイルス抵抗性遺伝子、耐病性遺伝子、貯蔵タンパク遺伝子、さらに選抜マーカーとしての薬剤耐性遺伝子などが挙げられるが、植物体内で機能する外来遺伝子であれば特に限定されるものではない。

【0026】本発明に用いられる外来遺伝子はそのまゝ使用することもできるが、塩基性物質と静電的にイオン結合した複合体を形成させることにより、形質転換率を

【0027】外来遺伝子と結合し、複合体を形成することのできる塩基性物質としては、例えば、スペルミン、スペルミジン、*di*-リジン、*tri*-リジン、ポリリジン、*di*-アルギニン、*tri*-アルギニン、ポリアルギニン、*di*-オルニチン、*tri*-オルニチン、ポリオルニチン、ヒストンH1、ヒストンH2、ヒストンH3、ヒストンH4などが挙げられ、水溶液中で正電荷を持つ物質であれば特に限定されないが、ポリオルニチン、スペルミン、スペルミジン、ヒストン、*di*-リジン、*tri*-リジンが好ましい。またこれらの塩基性物質は2種以上混合して使用してもよい。

【0028】これらの塩基性物質は外来遺伝子は、外来遺伝子を植物細胞内で安定に保つことと、染色体に組み込みやすくするために使用する。外来遺伝子に対する塩基性物質の量は、外来遺伝子が10 $\mu$ gに対して塩基性物質が0.1~300 $\mu$ g、好ましくは1~80 $\mu$ g使用される。

【0029】次に、植物細胞または、植物組織、ウイスカおよび外来遺伝子を分散させる液体は、植物細胞とウイスカとを懸濁させ、外来遺伝子を溶解させる目的で使用され、蒸留水、等張液、緩衝液、組織培養用培地などが挙げられる。

【0030】その際の等張液としては、例えばKCl、NaCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>などの無機塩を添加して0.01~7M、好ましくは、0.5~2Mにした液体が挙げられる。緩衝液としては、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、MES緩衝液などが挙げられる。

【0031】組織培養用培地としては、例えばMS培地としては、例えばMS培地、ガンボルグのB5培地、R2培地、ホワイト培地、ニッチーニッチ培地、N6培地などが挙げられる。

【0032】等張液または組織培養用培地を用いる場合は糖類を添加して用いるのがよく、その際の糖類としては、例えばショ糖、果糖、ブドウ糖、ソルビトール、マンニトールなどが挙げられ、糖類の濃度は0.01~7M、好ましくは0.5~2Mで使用される。

【0033】本発明に用いる液体のpHは、pH4~8、好ましくはpH5~7である。本発明に用いる液体の容量は、特に限定されるものではないが、植物細胞の

容量（圧縮細胞量：Packed Cell Volume、以下、「PCV」と略す）がPCV 1mlに対して、10 $\mu$ l~2ml、好ましくは、300~700 $\mu$ lになるよう調整して用いる。

【0034】本発明に用いる植物細胞の容量は、特に限定されるものではないが、植物細胞と共に液体中に混合されるウイスカの量は植物細胞の容量に伴い調整され、植物細胞量のPCV 1ml当たり、ウイスカ1~100mg、好ましくは、4~40mgになるように添加される。

【0035】本発明に用いる外来遺伝子、または外来遺伝子の塩基性物質との複合体の量は、PCV 1mlに対して、0.1~1000 $\mu$ g、好ましくは、10~200 $\mu$ gになるように添加される。

【0036】このようにして得られた上記植物細胞、ウイスカおよび外来遺伝子は液体と一緒に同一容器に加えて混合する。本発明で使用する容器は、例えば、遠心管、ガラス試験管、ポリプロピレン製試験管、シャーレ、フラスコなどが使用できるが、無菌で取り扱える容器であれば、これらに限定されるものではない。

【0037】植物細胞、ウイスカおよび外来遺伝子は、液体中で均一に混合され、分散されるよう容器を振って攪拌するが、特に激しく攪拌する必要はない。このようにして、液体中に分散させた植物細胞、ウイスカおよび外来遺伝子の混合物（以下、「混合物」と略す）を得ることができる。

【0038】〔2〕工程（b） 遠心処理

本工程は、混合物を遠心処理することによりウイスカを植物細胞へ付着させる工程である。本発明ににおける遠心処理は、遠心加速度が3,000~50,000 $\times$ g、好ましくは、10,000~30,000 $\times$ gで、遠心時間が、10秒~40分、好ましくは、5~10分間行う。また、植物細胞へのウイスカの付着量が高めるために同様の遠心処理を1~20回、好ましくは、3回繰り返して行うのよい。

【0039】〔3〕工程（c） 超音波処理

本工程は、遠心処理を行った後、混合物を超音波照射することによりウイスカを振動させ、ウイスカにより細胞を穿孔し、外来遺伝子を孔から細胞内に導入させる工程である。

【0040】本発明に用いる超音波処理は、前記した従来技術よりも穏やかな条件、すなわち、周波数が1k~1MHz、好ましくは、10~60kHzで、照射時間が0.2秒~20分間、好ましくは、30秒~2分間で、強度は、0.01~10W/cm<sup>2</sup>、好ましくは、0.1~1W/cm<sup>2</sup>で照射を行う。

【0041】超音波処理を行った後、外来遺伝子を細胞内に侵入させ拡散させるのに十分な時間、混合物を静置する。その際の温度は0~28℃、好ましくは4℃で、静置時間は1分~3時間、好ましくは5~10分間静置



するほうがよい。

【0042】本発明においては、ウイスカの使用と超音波処理を組み合わせることでウイスカを振動させることにより、従来技術よりも穏やかな条件でウイスカを細胞内に侵入させることができるため、細胞に重大な損傷を与えることなく高い形質転換効率が得られると推定される。

【0043】〔4〕工程(d) 植物体再生工程  
本工程は、(c)工程で得られた形質転換細胞から植物体を再生させて形質転換植物の作出を行う工程である。

【0044】本工程を行うにあたって、発現可能な外来遺伝子を植物細胞に導入した場合には、上述の如く、遠心処理と超音波処理を行った後、予め植物細胞を培養して外来遺伝子を発現させる。

【0045】上記のようにして超音波処理された混合物は、そのまま培養することもできるが、好ましくは、混合物からウイスカと外来遺伝子を取り除くため洗浄を行う。その際に用いる洗浄液は、蒸留水、等張液、緩衝液、培地などが挙げられるが、好ましくは、前述の等張液または培地を用いる。

【0046】洗浄は、滅過等の操作によって、混合物から植物細胞を取り出すことができればよく、特に操作が限定されることはないが、例えば、40 $\mu$ mのナイロンメッシュ等の篩を用いて混合物を洗浄し、植物細胞を取り出すことができる。

【0047】このようにして得られた植物細胞を、植物組織培養用培地を用いて、培養する。この際用いられる培地は、前述した植物組織培養用培地に必要に応じて、植物ホルモンとして、例えば、2, 4-PA、ナフタレン酢酸、インドール酢酸などのオーキシニン類、ベンジルアデニン、カイネチンなどのサイトカイニン類を単独もしくは混合して用い、炭素源として、例えば、ショ糖、グルコースなどを添加して用いることができるが、形質転換の目的とする植物種に応じて培地の選択をすることができる。

【0048】培養は、液体培地もしくは、固体培地で15~30℃、好ましくは、20~28℃、培養期間は6時間~7日間、好ましくは、2~3日間で行うことによって、外来遺伝子を植物細胞内で発現させた分裂細胞を得ることができる。

【0049】この際、これらの分裂細胞は、外来遺伝子が導入され、形質転換された形質転換細胞と非形質転換細胞とが混在しており、効率的に形質転換植物を得るために、形質転換細胞を分裂細胞の中から選抜し、分離することが望ましい。

【0050】例えば、導入に用いた外来遺伝子上に選抜マーカーとなる薬剤耐性遺伝子、例えば、抗生物質ハイグロマイシン耐性遺伝子を保有させておくことにより、薬剤による細胞の代謝阻害効果を利用して、形質転換細胞を選抜することができる。この選抜を行うためには、前記に得られた分裂細胞をあらかじめ指標となる薬剤を

添加した植物組織培養用培地から成る固体もしくは液体の選抜培地に置床、もしくは懸濁し、20~60日間、好ましくは30~40日間培養する。

【0051】選抜培地に添加される薬剤は、例えばハイグロマイシン、カナマイシンなどを用いることができ、濃度は1~300mg/リットル、好ましくは25~50mg/リットルで用いるが、薬剤の種類、濃度は植物種に応じて選択することができ、特にこれらに限定されるものではない。

【0052】また、外来遺伝子の種類により形質転換細胞数も変動する。例えば、ハイグロマイシン耐性遺伝子を用いた場合、GUS遺伝子よりも形質転換細胞が減少する傾向にある。

【0053】本発明における植物体再生方法としては、上記のようにして得られた形質転換細胞を公知の植物体再生用培地に置床することにより行うことができる。

【0054】植物体再生用培地に置床された形質転換細胞は15~30℃、好ましくは、20~28℃で、照射は500~2,000ルクス、好ましくは、800~1,000ルクスで、培養期間は、20~60日間、好ましくは30~40日間培養すると、個々の細胞から目的とする外来遺伝子が導入され、形質転換された植物体が再生する。

【0055】

【実施例】以下に、本発明の実施例を示して具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0056】

【実施例1】

<1>工程(a)

(1) 供試植物細胞の調製

イネ(品種日本晴)完熟種子の籾を脱穀し、70%エタノール溶液に10秒間、次いで有効塩素約1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に6分間浸漬して殺菌処理した後、滅菌水で洗浄した。

【0057】MS培地の無機成分組成にショ糖30g/リットル、2, 4-PA 2mg/リットル、寒天8g/リットルを添加して得た培地(pH5.8)を直径90mmのシャーレに入れて固化させて固体培地を調製した。

【0058】この固体培地に上記で得た種子を1シャーレに9個置床し、28℃で14日間、明所(2,000ルクス、1日当たり16時間照明)にて培養し、カルスを得た。R2培地の無機成分組成にショ糖30g/リットル、2, 4-PA 2mg/リットル、カサミノ酸2g/リットルを添加して得た液体培地(pH5.8)を100ml容の三角フラスコに50ml入れて、オートクレーブにより滅菌処理を行い、液体培地を調製した(以下、この液体培地を「R2D2培地」と略す。)

【0059】このR2D2培地に上記で得たカルスを胚





乳から切りだし、これを1フラスコ当たり10個移植し、温度28℃で、明所（2,000ルクス、1日当たり16時間照明）にて、ロータリーシェーカー（100rpm/分）を用いて振盪培養することによって懸濁培養細胞を得た。この懸濁培養細胞は7日ごとに、PCVで3mlを新鮮なR2D2培地に移植し、継代培養した。継代培養28日後のイネカルスを、孔1mmのステンレスメッシュの篩を用いて、1mm以下のカルスを1シャーレ当たりPCVで3ml得た。

【0060】得られた1mm以下のイネカルスはR2D2培地で3回洗浄し、試験に供した。

【0061】（2）ウイスカの調製

チタン酸カリウム製ウイスカ（チタン工業株式会社の製品「LS20」）5mgを1.5ml容のチューブ（エッペンドルフ社製）に入れ、エタノールを0.5ml加えて、一晩放置後、エタノールを完全に蒸発させて、殺菌されたウイスカを得た。このウイスカの入ったチューブに滅菌水1mlを入れ、よく攪拌した後、これを3000rpm/分、5分間遠心分離し、上清の水を捨てウイスカを洗浄した。この洗浄操作を3回行った後、同チューブ内にR2D2培地を0.5ml加えてウイスカ懸濁液を得た。

【0062】（3）外来遺伝子の調製

外来遺伝子はβ-グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子保有のpBI221（クローンテック社製）を用いた。

【0063】プラスミド（PBI221）は1mg/mlの濃度でTE緩衝液（Tris-HCl 10mM、EDTA 1mM、pH8.0）に溶解し、使用した。

【0064】（4）GUS遺伝子の導入操作

上記（2）で得られたウイスカ懸濁液の入ったチューブに上記（1）で得られた1mm以下のカルスをPCVで250μl入れて、攪拌後、1,000rpm/分で10秒間遠心を行い、カルスとウイスカを沈殿させ、上清を捨て、カルスとウイスカの混合物を得た。

【0065】また、上記（3）で得たGUS遺伝子溶液20μl（20μg含有）に対してR2D2培地10μlを加え、混合した後、上記のカルスとウイスカの混合物の入ったチューブに加え、カルス、ウイスカおよび外来遺伝子が添加された混合物を十分振り混ぜて混合物を得た。

【0066】＜2＞工程（b）

次に、この混合物の入ったチューブを18,000xgで5分間遠心分離し、遠心後、再度振り混ぜた。この遠心分離し、再度振り混ぜる操作を3回行った。

【0067】＜3＞工程（c）

（1）超音波処理

このようにして得た混合物の入ったチューブを超音波発生機（浴槽型：媒体として水を使用）の浴槽にチューブが十分浸かるように設置し、周波数40kHz、強度0.25W/cm<sup>2</sup>で1分間超音波を照射し、照射後、

30分間、4℃で放置した。

【0068】このように超音波処理し混合物を40μm孔のナイロンメッシュで濾過し、さらに、R2D2培地5mlを加えて洗浄しこの操作を3回くりかえし、GUS遺伝子を導入したカルスを得た。

【0069】（2）分裂細胞の培養

GUS遺伝子を導入したカルスを3.5cmのシャーレに入れ、R2D2培地を3ml加えて、28℃、明所（2,000ルクス、1日当たり16時間照明）にて、ロータリーシェーカー（50rpm/分）を用いて培養し、分裂細胞を得た。

【0070】（3）形質転換細胞数の選抜

GUS遺伝子が導入された細胞数の測定は、次のようにして行った。すなわち、上記（2）の分裂細胞の培養において、培養2日目にR2D2液体培地のみを取り除き、シャーレ中にカルスのみを残し、1mM X-Glu（5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide）溶液300μlをシャーレ中へ添加し、36℃、暗所で、24時間放置し、酵素反応を行った。このGUSアッセイにより、カルス中の、GUS遺伝子が導入され形質転換された細胞のみが青く発色されるので、これらの細胞を顕微鏡下で選抜し、形質転換細胞数を調べた。その結果を表1に示した。

【0071】

【実施例2】チタン酸カリウム製ウイスカ（チタン工業株式会社の製品「LS20」）1gを500ml容ナス型フラスコに入れ、トルエン100mlを加え、さらに3-（2-アミノエトキシ）アミノプロピル-トリメトキシシラン（カップリング剤）1gを加え溶解した後、このフラスコ内のトルエンの温度を120℃となるようにしてシリコンオイルバス中で攪拌し、トルエンを留去し、スラリーを得た。

【0072】反応後、スラリーを90%メタノールで洗浄し、過剰のカップリング剤を取り除いた。さらに洗浄に用いたメタノールの残液をロータリーエバポレーターで完全に留去し、表面塩基性ウイスカを得た。

【0073】上記で得た表面塩基性ウイスカは実施例1と同様の方法で殺菌した後、R2D2培地を加えて混合物を得た。

【0074】GUS遺伝子20μgを含むTE緩衝液20μlにR2D2培地40μlを加え、この溶液にポリオルニチン2.5μg、スペルミジン50μg、スペルミン18μg、ヒストンH220μgを、それぞれ単独にR2D2培地60μlに溶解して加え、室温で10分間静置し、4種類のGUS遺伝子の塩基性複合体を調製した。

【0075】これらのGUS遺伝子の塩基性複合体と上記の表面塩基性ウイスカの混合物を用いて実施例1と同様の方法で形質転換細胞を得て、GUSアッセイを行い



形質転換細胞数を調べた。その結果を表1に示した。

【0076】

【比較例1】遺伝子導入時に遠心処理のみを行い、超音波処理を省いた以外は、実施例1に準じて分裂細胞のGUSアッセイを行い形質転換細胞をえた。その結果を表1に示した。

【0077】

【比較例2】遺伝子導入時に遠心処理を省き、超音波処理のみを行った以外は、実施例1に準じて、分裂細胞のGUSアッセイを行い形質転換細胞を得た。その結果を\*10

\*表1に示した。

【0078】

【比較例3】遺伝子導入時にウイスカの添加を省き、1. 5ml容チューブに1mm以下のカルスPCV 250 $\mu$ lと外来遺伝子溶液20 $\mu$ l、R2D2培地100 $\mu$ lを入れて得た混合物を用いた以外は、実施例1と同様にして分裂細胞のGUSアッセイを行い、形質転換細胞を得た。その結果を表1に示した。

【0079】

【表1】

表1

	遺伝子導入操作	ウイスカの有無	外来遺伝子と複合体を形成する塩基性物質	形質転換細胞数
実施例1	遠心処理+超音波処理	有	なし	861
実施例2	同上	有	ポリオルニチン	3,099
	同上	有	スベルミン	2,913
	同上	有	スベルミジン	3,510
	同上	有	ヒストン	1,542
比較例1	遠心処理のみ	有	なし	9
比較例2	超音波処理のみ	有	なし	9
比較例3	遠心処理+超音波処理	なし	なし	0

【0080】

【実施例3】

(1) 供試植物細胞の調製は実施例1に準じて行った。

(2) ウイスカの調製は実施例1に準じて行った。

(3) 外来遺伝子の調製

外来遺伝子は、ハイグロマイシン耐性遺伝子保有のプラスミドpCH(東京大学より分譲)を用いた。

(4) ハイグロマイシン耐性遺伝子の導入操作は、実施例1に準じて行った。

【0081】(5) 分裂細胞の培養

ハイグロマイシン耐性カルスを3.5cmのシャーレに入れ、R2D2培地を3ml加えて、28℃、明所(2,000ルクス、1日当たり16時間照明)にて、ロータリーシェーカー(50rpm/分)を用いて培養し、分裂細胞を得た。

【0082】(6) 形質転換細胞の選抜

上記(5)に準じて培養を行い、培養3日目に、これら

の分裂細胞の懸濁液3mlを2,4-PA 2mg/リットル、ショ糖30g/リットル、グルライト3g/リットル、およびハイグロマイシン50mg/リットルを含むN6培地(pH5.8)30mlを直径9cmの大きさのシャーレ中で固化させた固体培地上に均一に広げた後、ピペットで懸濁液の液体を吸い取った。

【0083】これを28℃、明所(2,000ルクス、1日当たり16時間照明)で20日間培養し、ハイグロマイシン耐性の形質転換細胞を得た。

【0084】(7) 形質転換細胞から植物体再生  
上記により得た形質転換培養細胞169個(直径約5mmに生育)をペンシルアデニン2mg/リットル、ナフタレン酢酸1mg/リットル、ショ糖30g/リットル、ソルビトール30g/リットル、グルライト3g/リットルを含むMS培地30mlを直径9cmの大きさのシャーレで固化させた再生用培地上に1シャーレ当たり10個置床し、28℃、明所(2,000ルクス、1日当たり16時間照明)で30日間培養すると、形質転



換細胞から芽と根が再生した。

【0085】再生した芽と根を含む幼芽（長さ10～30mmに生育）をショ糖3%、ゲルライト3g／リットルを含むMS培地50mlをプラントボックス（縦5cm×横5cm×高さ10cm）中で固化させた固体培地に各々1本ずつ移植し、20日間培養して形質転換植物を135個体得た。その結果を表2に示す。

【0086】（8）形質転換植物の遺伝子解析

PCR（polymerase chain reaction）法によるハイグロマイシン耐性遺伝子を保持する植物体の解析を行った。

【0087】上記（7）で得た再生植物体の葉50mgを1.5ml容のマイクロチューブに入れ、10mM EDTAを含む20mM Tris-HCl緩衝液（pH7.5）300μlを添加し、これを磨砕した後、20%SDSを20ml加えて、65℃で10分間加温した。これに5M酢酸カリウムを100μl加え、氷中に20分間置いた後、1,7000×gの遠心加速度で20分間遠心分離を行い、得られた上清にインプロパノール200μlを加え、転倒攪拌し、これを再び1,7000×gの遠心加速度で20分間遠心分離し、この沈殿を減圧下で乾燥させ、100μlのTE緩衝液に溶解しDNAを得た。

【0088】PCR用のプライマーとして、公知のハイグロマイシン耐性遺伝子の配列を基に、配列番号1及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。次に、これらのオリゴヌクレオチド各1μMをプライマーとし、上記植物体由来のDNA5μlをテンプレートとして、これらを含む反応液（10mM Tris-HCl（pH8.3）、1.0mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、0.01%ゼラチン、pH8.3、dNTP 各0.2mM mixture、Taq DNA polymerase 2.5ユニット）100μlで、増幅反応を行った。反応液は、PCRキット（PCR Amplification Kit（宝酒造（株）社製）を用いて調製した。

【0089】増幅反応は、PCR反応装置（Program Temp Control System PCR-700（アズテック社製））を用いて、変性94℃、1分、アニーリング60℃、30秒、伸張（extension）72℃、1分の3つの反応条件を30回繰り返して行った。

【0090】PCR反応液を常法によりアガロース電気泳動で分析したところ、再生植物から抽出したDNAから375bpの増幅されたDNAバンドが確認された。このDNAバンドパターンより、イネ再生植物体135個体中の全てにハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれていることが確認できた。その結果を表2に示す。

【0091】

【実施例4】

（1）供試植物細胞の調製

トウモロコシ（品種A188）の交配10日目の未熟胚（1～1.2mm長）を無菌状態に取り出し、N6培地の無機成分組成にショ糖20g／リットル、2,4-PA 2mg／リットル、L-プロリン2.9g／リットル、カサミノ酸100mg／リットル、寒天9g／リットルを添加して得た培地（pH5.8）を直径9cmの大きさのシャーレ中で固化させた固体培地（以下、「N6S2培地」と略す）上に、1シャーレ当たり9個置床し、28℃、暗所で、21日間培養し、カルスを得た。

【0092】「（2）ウイスカの調製」および「（4）ハイグロマイシン耐性遺伝子の導入操作」は実施例1に準じて、また、「（3）外来遺伝子の調製」は実施例2に準じて行った。

【0093】（5）分裂細胞の培養

ハイグロマイシン耐性カルスを個々にピンセットでN6S2培地上に置床し、28℃、暗所で7日間培養し分裂細胞を得た。

【0094】（6）形質転換細胞の選抜

上記（5）に準じて培養し、培養7日目のカルスを分割せずにそのままハイグロマイシン50mg／リットルを添加したN6S2培地に移植し、28℃暗所で30日間培養しハイグロマイシン耐性の形質転換細胞を得た。

【0095】（7）形質転換細胞からの植物体の再生

上記（6）により得た形質転換培養細胞101個（直径約5mmに生育）を、ショ糖10g／リットル、ゲルライト3g／リットルを含む1/2無機塩濃度のN6培地（pH5.8）に直径9cmの大きさの1シャーレ当たり6個のカルスを置床し、28℃、明所（2,000ルクス、1日当たり16時間照明）で30日培養すると、形質転換培養細胞から芽と根が再生した。

【0096】再生した芽と根を含む幼芽（長さ10～30mmに生育）をショ糖30g／リットル、ゲルライト3g／リットルを含むMS培地50mlをプラントボックス（縦5cm×横5cm×高さ10cm）中で固化させた固体培地に各々1本ずつ移植し、20日間培養して形質転換植物を30個体得た。その結果を表2に示す。

【0097】（8）形質転換植物の遺伝子解析

実施例2の方法に準じて解析を行ったところ、トウモロコシ再生植物体30個体中26個体にハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれていることが確認された。その結果を表2に示す。

【0098】

【比較例4】遺伝子導入時に遠心処理のみを行い、超音波処理を省いた以外は、実施例3と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0099】

【比較例5】遺伝子導入時に遠心処理を省き、超音波処理のみを行った以外は、実施例3と同様にして分裂細胞



のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0100】

【比較例6】遺伝子導入時にウイスカの添加を省き、

1. 5ml容チューブに1mm以下のカルスPCV 250 $\mu$ lと外来遺伝子溶液20 $\mu$ l、R2D2培地100 $\mu$ lを入れて得た混合物を用いた以外は、実施例3と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0101】

【比較例7】遺伝子導入時に遠心処理のみを行い、超音波処理を省いた以外は、実施例4と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0102】

【比較例8】遺伝子導入時に遠心処理を省き、超音波処理のみを行った以外は、実施例4と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0103】

【比較例9】遺伝子導入時にウイスカの添加を省き、1. 5ml容チューブに1mm以下のカルスPCV 250 $\mu$ lと外来遺伝子溶液20 $\mu$ l、N6S2培地100 $\mu$ lを入れて得た混合物を用いた以外は、実施例4と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0104】

【実施例5】

(1) 供試植物細胞の調製

芝草ベントグラス(品種ペンクロス)の完熟種子を70%エタノール溶液に10秒間、次いで有効塩素約1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に20分間浸漬して殺菌処理をした後、滅菌水で洗浄し、B5培地の無機成分組成にショ糖30g/リットル、2,4-PA 3mg/リットル、ゲルライト3g/リットルを添加して得た培地(pH5.8)を直径9cmの大きさのシャーレ中で固化させて固体培地(以下、「B5D3培地」と略す)上に、1シャーレ当たり100個置床し、28℃、明所(2,000ルクス、1日当たり16時間照明)で、60日間培養し、カルスを得た。

【0105】「(2)ウイスカの調整」および「(4)ハイグロマイシン耐性遺伝子の導入操作」は実施例1に準じて、また、「(3)外来遺伝子の調製」は実施例2に準じて行った。

【0106】(5) 分裂細胞の培養

ハイグロマイシン耐性カルスを個々にピンセットでB5D3培地上に置床し、28℃、明所(2,000ルクス、1日当たり16時間照明)で7日間培養し分裂細胞\*

\*を得た。

【0107】(6) 形質転換細胞の選抜

上記(5)に準じて培養し、培養7日目のカルスを分割せずにそのままハイグロマイシン50mg/リットルを添加したB5D3培地に移植し、28℃、明所(2,000ルクス、1日当たり16時間照明)で40日間培養しハイグロマイシン耐性の形質転換細胞を得た。

【0108】(7) 形質転換細胞からの植物体の再生

上記(6)により得た形質転換培養細胞57個(直径約1cmに生育)をショ糖30g/リットル、ソルビトール30g/リットル、ベンジルアデニン0.3mg/リットル、ナフタレン酢酸0.3mg/リットル、ゲルライト3g/リットルを含む1/2無機塩濃度のMS培地(pH5.8)に直径9cmの大きさのシャーレ当たり6個のカルスを置床し、28℃、明所(2,000ルクス、1日当たり16時間照明)で50日間培養すると、形質転換培養細胞から芽が再生した。

【0109】再生した芽(長さ3~5mmに生育)をショ糖30g/リットル、ゲルライト3g/リットルを含む1/2無機塩濃度のMS培地30mlを試験管(縦15cm×直径4cm)中で固化させた固体培地に各々1本ずつ移植し、30日間培養すると、生育した芽の基部に根が形成した形質転換植物を49個体得た。その結果を表2に示す。

【0110】(8) 形質転換植物の遺伝子解析

実施例3の方法に準じて解析を行ったところ、芝草の再生植物体49個体中44個体にハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれていることが確認された。その結果を表2に示す。

【0111】

【比較例10】遺伝子導入時に遠心処理のみを行い、超音波処理を省いた以外は、実施例5と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0112】

【比較例11】遺伝子導入時に遠心処理を省き、超音波処理のみを行った以外は、実施例5と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0113】

【比較例12】遺伝子導入時にウイスカの添加を省き、1. 5ml容チューブに1mm以下のカルスPCV 250 $\mu$ lと外来遺伝子溶液20 $\mu$ l、B5D3溶液100 $\mu$ lを入れて得た混合物を用いた以外は、実施例5と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0114】

【表2】





表2

	植物種	遺伝子導入操作	ウイスカの有無	外来遺伝子と複合体を形成する塩基性物質	形質転換細胞数 (ハイロマイシン耐性数)	再生植物体数
実施例3	イネ	遠心処理+超音波処理	有	なし	169	135
比較例4	イネ	遠心処理のみ	有	なし	0	0
比較例5	イネ	超音波処理のみ	有	なし	0	0
比較例6	イネ	遠心処理+超音波処理	なし	なし	0	0
実施例4	トウモロコシ	遠心処理+超音波処理	有	なし	101	26
比較例7	トウモロコシ	遠心処理のみ	有	なし	0	0
比較例8	トウモロコシ	超音波処理のみ	有	なし	0	0
比較例9	トウモロコシ	遠心処理+超音波処理	なし	なし	0	0
実施例5	芝草	遠心処理+超音波処理	有	なし	57	44
比較例10	芝草	遠心処理のみ	有	なし	0	0
比較例11	芝草	超音波処理のみ	有	なし	0	0
比較例12	芝草	遠心処理+超音波処理	なし	なし	0	0

## 【0115】

【発明の効果】本発明によれば植物の種、品種、系統に左右されず、容易かつ短時間に植物の形質転換を行うことができ、効率よく形質転換植物を作出することができる。

## 【0116】

## 【配列表】

## 配列

GCTGGGGCGT CGGTTCCAC TATCCG

26

## 【0117】配列番号：2

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

## 配列

CGCATAACAG CGGCATTGA CTGGAGC

27

## \* 配列番号：1

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

\* アンチセンス:NO

## ※トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス:YES

※



**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification 7 :</b> <b>C12N 15/82, A01H 5/00, 5/10</b>	<b>A2</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 00/37663</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 29 June 2000 (29.06.00)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US99/30972 <b>(22) International Filing Date:</b> 23 December 1999 (23.12.99)  <b>(30) Priority Data:</b> 60/113,717 23 December 1998 (23.12.98) US 60/145,373 23 July 1999 (23.07.99) US  <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION, INC. [US/US]; 2510 Sam Noble Parkway, Ardmore, OK 73401 (US).  <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> HARRISON, Maria, J. [GB/US]; HC60, Box 26A1, Ardmore, OK 73401 (US). TRIEU, Anthony, T. [US/US]; 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268 (US).  <b>(74) Agents:</b> HANSEN, Eugenia, S. et al.; Sidley & Austin, Suite 3400, 717 North Harwood, Dallas, TX 75201 (US).		<b>(81) Designated States:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Published</b> <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>
<b>(54) Title:</b> PLANT TRANSFORMATION PROCESS  <b>(57) Abstract</b>  A method of <i>Agrobacterium</i> -mediated genetic transformation using seedlings has been found which is applicable to dicots and monocots capable of being transformed by <i>Agrobacterium</i> . The transformation method utilizes vacuum-infiltration to introduce the <i>Agrobacterium</i> T-DNA carrying a gene of interest into the seedlings. Upon maturity, seeds collected from the infiltrated seedlings are germinated, and progeny carrying the transgene are selected. This transformation method produces progeny exhibiting stable inheritance of the transgene without the need for regeneration methods such as somatic embryogenesis or organogenesis.		



**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						



## PLANT TRANSFORMATION PROCESS

## BACKGROUND

Genetic transformation of higher plants promises to have a major impact on crop improvement, as well as many other areas of biotechnology. Genetic transformation can be used to produce transgenic plants carrying new genetic material stably integrated into the genome and to engineer 'designer' crops with specific traits. Various methods of genetic transformation have been developed and applied to a growing number of plant species. However, the ease and success rate of genetic transformation methods varies widely among plant species [Muller, et al. 1987. "High meiotic stability of a foreign gene introduced into tobacco by *Agrobacterium*-mediated transformation," *Mol Gen Genet* 207:171-175; Gasser, C.S. and Fraley, R.T. 1989. "Genetically engineering plants for crop improvement," *Science* 244:1293-1299; Umbeck, et al. 1989. "Inheritance and expression of genes for kanamycin and chloramphenicol resistance in transgenic cotton plants," *Crop Science* 29:196-201; Gordon-Kamm, et al. 1990. "Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants," *Plant Cell* 2:603-618; Chabaud, et al. 1996. "Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with *MtENOD12* nodulin promoter fused to the *gus* reporter gene," *Plant Cell Rep* 15:305-310; Kar, et al. 1996. "Efficient transgenic plant regeneration through *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.)," *Plant Cell Rep* 16:32-37; Kim, J.W. and Minamikawa, T. 1996. "Transformation and regeneration of French bean plants by the particle bombardment process," *Plant Sci* 117:131-138; Trieu, A.T. and Harrison, M.J. 1996. "Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis," *Plant Cell Rep* 16:6-11; Bean, et al. 1997. "A simple system for pea transformation," *Plant Cell Rep* 16:513-519; Cheng, et al. 1997. "Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*," *Plant Physiol* 115:971-980; Cheng, et al. 1997. "Expression and inheritance of foreign genes in transgenic peanut plants generated by *Agrobacterium*-mediated transformation," *Plant*





*Cell Rep* 16:541-544; and Tingay, et al. 1997. "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation," *Plant J* 11:1369-1376.]

The most common and widely used method of transformation of dicotyledonous plants utilizes a bacterium, *Agrobacterium tumefaciens*, to effect gene transfer.

5 *Agrobacterium tumefaciens* is a gram-negative, soil dwelling plant pathogen that infects its plant host and subsequently delivers and integrates part of its genetic material into the plant genome. The transferred portion of DNA is termed the T-DNA fragment, and additional genetic material can be added to the T-DNA. The additional genetic material will then be integrated into the genome along with the T-DNA. In this way,  
10 *Agrobacterium* can be used to facilitate the transfer of new genes into the plant genome (Fraley, et al. 1983. "Expression of bacterial genes in plant cells," *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4803-4807).

While transformation with *Agrobacterium* has worked well for a number of model species such as tobacco and petunia, the approach is subject to a number of  
15 limitations. Some plant species, including many monocotyledonous plant species, are not readily susceptible to infection by *Agrobacterium* (Potrykus, I. 1990. "Gene transfer to cereals: an assessment," *Bio/Technology* 8:535-542). In these cases, alternative approaches have been used, including particle bombardment and direct gene transfer into protoplasts via electroporation, microinjection, or polyethylene glycol mediated  
20 uptake [Klein, et al. 1987. "High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells," *Nature* 327:70-73; McCabe, et al. 1988. "Stable transformation of soy bean (*Glycine max*) by particle acceleration," *Bio/Technology* 6:923-926; Bommineni, et al. 1994. "Expression of GUS in somatic embryo cultures of black spruce after microprojectile bombardment," *J Exp Bot* 45:491-495; Christou, P. 1995. "Strategies  
25 for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment," *Eupytica* 85:13-27; Kim and Minamikawa. 1996. *Plant Sci* 117:131-138; Klein, et al. 1998. "Stable genetic transformation in intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process," *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8502-8505].



Regardless of the method of delivery of the new genetic material, it is necessary to regenerate whole fertile plants from the transformed cells. The production of stably transformed transgenic plants involves two processes: transformation of plant cells and then regeneration of those transformed cells to whole plants. In most cases, a plant tissue explant is incubated with *Agrobacterium* carrying a T-DNA containing a selectable marker gene and a 'gene of interest'. A proportion of the cells in the explant will become transformed, and whole plants are then regenerated from these cells via somatic embryogenesis or direct organogenesis. Transformants are selected by inclusion of the appropriate selective conditions in the regeneration media. The choice of tissue explant depends on the plant species. Leaf, cotyledons, hypocotyls, cotyledonary meristems, and embryos are among those that have been used successfully.

Because neither the transformation nor the regeneration are 100% effective, the chance of obtaining a transformed plant depends on these two processes occurring consecutively in the same cell. In many cases, the production of transgenic plants is prevented due to the inability to regenerate plants from those tissues susceptible to transformation. For species in which somatic embryogenesis is a viable method of regenerating plants, there are other limitations. Plants regenerated via somatic embryogenesis may show significant somatic variation, altered ploidy, phenotypic abnormalities and poor fertility (Bean, et al. 1997. *Plant Cell Rep* 16:513-519). While regeneration via direct organogenesis overcomes some of these problems, not all plants can be regenerated in this way. Finally, although transformation of many crop plants is possible, it is usually achieved in highly regenerable lines or cultivars, and the elite agriculturally important lines are not usually amenable to transformation. Therefore, introduction of a desired trait into the elite lines has been limited to subsequent traditional breeding methods following transformation of parental lines.

In order to develop a transgenic plant line expressing a new trait, it is desirable to produce a large number of transgenic plants from which the best expressing line can be selected. The requirement for a number of plant lines stems from the fact that the integration of the T-DNA fragment into the plant genome is a random event, and therefore, each transgenic plant will contain the new gene integrated into different sites



of the genome. Due to this phenomenon termed 'position effect', the various transgenic lines will vary in the levels of expression of the introduced gene (Ulian, et al. 1994. "Expression and inheritance pattern of two foreign genes in petunia," *Theor Appl Genet* 88:433-440). Therefore, it is desirable to produce a large number of transgenic lines in order to select for those expressing the introduced gene at a high level.

The only plant which has been successfully transformed with a high degree of ease and efficiency is *Arabidopsis thaliana*, a model plant used widely for genetic and molecular analyses of plant developmental processes. A direct method of transformation has been developed for *Arabidopsis thaliana* (Bechtold, et al. 1993. "In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants," *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III Sciences de la vie* 316.). In this transformation process, the plant is (1) grown to maturity, (2) immersed in a suspension of *Agrobacterium* cells, (3) held under vacuum for a short period of time, and then (4) allowed to set seed. A proportion of the progeny is transformed. Recent data suggest that the gametophyte progenitor, gametophyte, or fertilized embryos are the targets (Bechtold, N. and Pelletier, G. 1998. "In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration," *Methods Mol Biol* 82:259-266). Although Bechtold's method has been tried in other species including *Brassica napus* and *Beta vulgaris*, these attempts reportedly have been unsuccessful (Siemens, J. Scheiler, O. 1996. "Transgenic plants: genetic transformation-recent developments and the state of the art," *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 2:66-75).

Leguminous crops such as peas, soybean, bean, alfalfa, peanut, chick pea, pigeon pea and clover have widespread economic importance throughout the world. Legumes are an important source of protein as grain and forage legume crops for animals and as grain legumes for humans. For example, soybeans (*Glycine max*) are a major source of protein in animal and human food, and soybean oil is the most widely used edible oil in the world. The productivity, and therefore value, of a wide range of leguminous crops could be increased by the introduction of traits such as disease resistance, herbicide resistance, insect resistance, reduced levels of tannins and lignin



(forage legumes), and improved protein and lipid quality. For example, the soybean cyst nematode causes losses in yield of up to one billion United States dollars per year. With the recent cloning of a beet cyst nematode resistance gene and a potato cyst nematode resistance gene (Williamson, V.M. 1999. *Curr Opin Plant Biol* 2:327-31), strategies are now being explored for genetically engineering resistance in plants.

While there have been some attempts to introduce these traits into leguminous crops via genetic engineering, the current transformation methods involving tissue culture are exceedingly labor intensive and inefficient. In particular, the large seed grain legumes, such as pea, bean, and soybean have proved very difficult to transform, and tissues susceptible to transformation have proven difficult to regenerate.

[Bingham, et al. 1975. "Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture," *Crop Science* 15:719-721; Hinchee, et al. 1988. "Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer," *Bio/Technology* 6:915-922; Schroeder, et al. 1993. "Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.)" *Plant Physiol* 101:751-757; Chabaud, et al. 1996. *Plant Cell Rep* 15:305-310; Kar, et al. 1996. *Plant Cell Rep* 16:32-37; Kim and Minamikawa. 1996. *Plant Sci* 117:131-138; Trieu and Harrison. 1996. *Plant Cell Rep* 16:6-11; Bean, et al. 1997. *Plant Cell Rep* 16:513-519; Cheng, et al. 1997. *Plant Cell Rep* 16:541-544; and Dillen, et al. 1997. "Exploiting the presence of regeneration capacity in the *Phaseolus* gene pool for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to the common bean. *Mededelingen-Faculteit-Landbouwkundige-en-Toegepaste-Biologische-Wetenschappen-Universiteit-Gent* 62:1397-1402].

In an alternative approach, it was shown that cells within a soybean meristem can be transformed by particle bombardment. However, this leads to chimeric plants with transformed sectors. Some of these sectors will eventually give rise to seed, and the seed will carry the transgene (McCabe, et al. 1988. *Bio/Technology* 6:923-926; Chowrira, et al. 1995. "Electroporation-mediated gene transfer into intact nodal meristems *in planta*: generating transgenic plants without *in vitro* tissue culture," *Molecular Biotechnology* 3:17-23; and Chowrira, et al. 1996. "Transgenic grain legumes obtained by *in planta* electroporation-mediated gene transfer," *Molecular Biotechnology* 5:85-96). While this procedure has enabled the production of transgenic





soybean, it is very labor intensive because numerous meristems need to be bombarded to have a realistic chance of obtaining any transgenic seeds.

*Medicago truncatula* Gaertn. (barrel medic) is a diploid, autogamous, annual medic that is grown as a pasture legume in a number of regions throughout the world, including Mediterranean areas, South Africa and Australia (Crawford, et al. 1989. "Breeding annual *Medicago* species for semiarid conditions in Southern Australia," *Adv Agron* 42:399-437). In Australia, the annual medics are the main legume found on over 50 million hectares of agricultural land, and a variety of species and ecotypes have been developed. The first commercial cultivar of *M. truncatula* was sown in 1938, and this species has been favored due to its ability to tolerate both low rainfall and high lime soils (Crawford, et al. 1989. *Adv Agron* 42:399-437). *Medicago truncatula* also is emerging as a model legume for studies of the nitrogen-fixing *Rhizobium*/legume symbiosis and the arbuscular mycorrhizal symbiosis [Cook, et al. 1995. "Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*," *Plant Cell* 7:43-55; van Buuren, et al. 1998. "Novel genes induced during an arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis between *M. truncatula* and *G. versiforme*," *MPMI* 12:171-181]. The attributes that make *M. truncatula* a useful model plant for molecular and genetic analyses include its small genome (4.5 times larger than *Arabidopsis*), rapid life cycle, and relatively small physical size (Barker, et al. 1990. "*Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis," *Plant Mol Biol Rep* 8:40-49). In addition, it can be transformed via *Agrobacterium* and regenerated via somatic embryogenesis, or alternatively, by direct organogenesis (Thomas, et al. 1992. "Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids," *Plant Cell Rep* 11:113-117; Chabaud, et al. 1996. *Plant Cell Rep* 15:305-310; Trieu and Harrison. 1996. *Plant Cell Rep* 16:6-11; Hoffmann, et al. 1997. "A new *Medicago truncatula* line with superior in vitro regeneration, transformation, and symbiotic properties isolated through cell culture selection," *Mol Plant-Microbe Interact* 10:307-315).

Although *Agrobacterium*-mediated transformation with regeneration via somatic embryogenesis or direct organogenesis is a viable approach, these methods are



very labor intensive, not very efficient, and in some cases, very slow. While these approaches may be suitable for the generation of small numbers of transgenic plants, they cannot be used to generate the large numbers of lines required for many genetic approaches and high through-put systems, such as T-DNA mutagenesis or activation tagging.

An *Agrobacterium*-mediated transformation method has now been found wherein seedlings, rather than flowering plants or tissue explants, are utilized as the subject biological material for exposure to *Agrobacterium* cells. Moreover, following maturation of treated plants and seed set, transgenic plants are selected directly from a population of progeny representing various insertional events. This seedling transformation method provides high efficiency, low labor input, and large numbers of transgenic plants without all the problems associated with transformation of flowering plants or tissue explants and regeneration via somatic embryogenesis or direct organogenesis.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 depicts a map of the T-DNA from the binary vector pBI121-*bar*.

Fig. 2(a) is a Southern blot of *Hind*III digested DNA from transgenic plants (progeny of infiltrated plants) hybridized with a *bar* probe. Samples 1.3-1.8 are from Treatment 1 (1-minute vacuum infiltration); Samples 2.2-2.7 are from Treatment 2 (1.15-minute vacuum infiltration); and Samples 3.1-3.5 are from Treatment 3 (40-second vacuum infiltration followed by 20-second hold). The pBI121-*bar* plasmid DNA is included to the left of the blot. This part of the blot was excised and exposed for a shorter time than the rest of the blot to prevent overexposure. C is DNA from a non-transformed control *M. truncatula* plant.

Fig. 2(b) is a Southern blot of *Hind* III digested DNA from transgenic plants (progeny of infiltrated plants) hybridized with a *bar* probe. Samples 1.3-1.8 are from Treatment 1 (1-minute vacuum infiltration); Samples 2.2-2.7 are from Treatment 2 (1.5-minute vacuum infiltration); and Samples 3.1-3.5 are from Treatment 3 (40-second



vacuum infiltration followed by 20-second hold). The pBI121-*bar* plasmid DNA is included to the left. This part of the blot was excised and exposed for a shorter time than the rest of the blot to prevent overexposure. C is DNA from a non-transformed control *M. truncatula* plant.

5            Fig. 3(a) is a Southern blot of *Hind*III digested DNA from transgenic plants (progeny of infiltrated plants) hybridized with a *npt II* probe. Samples 1.6-1.20 are from Treatment 1 (1-minute vacuum infiltration) and Samples 2.12 and 2.13 are from Treatment 2 (1.15-minute vacuum infiltration). C is DNA from a non-transformed control *M. truncatula* plant.

10           Fig. 3(b) is a Southern blot of *Hind*III digested DNA from transgenic plants (progeny of infiltrated plants) hybridized with a *bar* probe. Sample 1.6-1.20 are from Treatment 1 (1-minute vacuum infiltration); and Sample 2.12 and 2.13 are from Treatment 2 (1.5-minute vacuum infiltration). C is DNA from a non-transformed control *M. truncatula* plant.

15           Fig. 4 is an agarose gel showing a portion of the *bar* gene that has been amplified from DNA from transgenic soybean plants via PCR with *bar* specific primers. The arrow points to a 423bp amplified fragment. The lane labeled "M" contains molecular weight markers. The 500 bp marker is indicated. Samples 6-27 are soybean transformants that survived the herbicide treatment. Transformants 6, 13, 14,  
20        15, and 16 show an amplified fragment of the correct size.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

25           In one aspect, the present invention is a method for direct plant transformation using seedlings and *Agrobacterium* comprising: (a) contacting at least one seedling with *Agrobacterium* cells which harbor a vector that enables the *Agrobacterium* cells to transfer T-DNA containing at least one gene or gene fragment to the seedling and (b)  
30           applying a vacuum to the seedling in contact with the *Agrobacterium* cells at one point in time, the vacuum being of sufficient strength to force the *Agrobacterium* cells into intimate contact with the seedling such that the *Agrobacterium* cells transfer the T-DNA to cells of the seedling at a second point in time, wherein the first point in time



and the second point in time are either the same or different. In a preferred method, the vector comprises a selectable marker gene. A preferred selectable marker gene is a herbicide resistance gene. A preferred herbicide resistance gene is a *bar* gene.

In another aspect, the present invention is a method for direct plant transformation using seedlings and *Agrobacterium* comprising: (a) contacting at least one seedling with a mixture of *Agrobacterium* cells, the mixture comprising cells from a *Agrobacterium* strain harboring a vector with a first DNA fragment and cells from the *Agrobacterium* strain harboring the vector with a second DNA fragment, wherein the vector enables the *Agrobacterium* cells to transfer the T-DNA to cells of the seedling; and (b) applying a vacuum to the seedling in contact with the mixture of *Agrobacterium* cells at a first point in time, the vacuum being of sufficient strength to force the *Agrobacterium* cells into intimate contact with the seedling such that the *Agrobacterium* cells transfer at least one gene to cells of the seedling at a second point in time, wherein the first point in time and the second point in time are the same or different. In a preferred method, the vector comprises a selectable marker gene. A preferred selectable marker gene is a herbicide resistance gene. A preferred herbicide resistance gene is a *bar* gene.

In another aspect, the present invention is a method for direct plant transformation using seedlings and *Agrobacterium* comprising: (a) contacting at least one seedling with *Agrobacterium* cells which harbor a vector that enables the *Agrobacterium* cells to transfer T-DNA containing at least one gene or gene fragment and a selectable marker gene to the seedling; (b) applying a vacuum to the seedling in contact with the mixture of *Agrobacterium* cells at a first point in time, the vacuum being of sufficient strength to force the *Agrobacterium* cells into intimate contact with the seedling such that the *Agrobacterium* cells transfer the T-DNA to cells of the seedling at a second point in time, wherein the first point in time and the second point in time are the same or different; (c) allowing the transformed seedling to grow to maturity and set seed; (d) germinating the seed to form progeny; (e) exposing the progeny to an agent enabling detection of selectable marker gene expression; and (f) selecting for progeny expressing the selectable marker gene and at least one gene, wherein expression of the selectable marker gene and at least one gene indicates gene





transfer. In a preferred method, the selectable marker gene is a herbicide resistance gene. A preferred herbicide resistance gene is a *bar* gene.

In yet another aspect, the present invention is a plant transformed according to the above-described methods of seedling transformation.

5 In yet another aspect, the present invention is a seed from a plant transformed according to the above-described methods of seedling transformation.

In yet another aspect, the present invention is a progeny plant from a seed obtained from a plant transformed according to the above-described methods of seedling transformation.

10

#### DETAILED DESCRIPTION

A plant transformation process has now been found which utilizes vacuum infiltration of seedlings to introduce *Agrobacterium* T-DNA carrying a selectable marker gene and the gene(s) of interest into the seedlings. A seedling as used herein is  
15 defined as a plant from about the beginning of seed germination to about the time true leaves develop. The transformation methods described herein can be applied to the seedlings of any plant, including dicots and monocots which can be successfully transformed by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. In particular, leguminous plants are transformed at high rates of efficiency.

20 The transformation method described herein is generally accomplished by growing the *Agrobacterium* strain carrying a gene(s) of interest under selective conditions in liquid culture until it reaches exponential growth phase. The *Agrobacterium* cells are then pelleted by centrifugation and resuspended in a vacuum infiltration medium. The seedlings are immersed in the *Agrobacterium* cell suspension  
25 and subjected to vacuum infiltration whereby the *Agrobacterium* cells are then introduced into the seedlings, resulting in infiltrated plants that subsequently produce transformed seed from which a transformed plant is obtained.

The transformation of seedlings is accomplished through *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Agrobacterium* strains useful in the transformation of a



seedling include any aggressive strain which, upon contact with a transformable plant cell, is capable of transferring T-DNA into the cell for integration into the plant's genome. In the transformation method described herein, the *Agrobacterium* strain can carry one plasmid with multiple gene(s) of interest. Alternatively, transformation is performed using a mixture of *Agrobacterium* cells in which the vector carries different fragments of DNA, e.g., selected fragments from a specific DNA library. To achieve the optimum transformation rate in a given plant, the *Agrobacterium* strain which provides the greatest number of transformed seedlings is selected. For leguminous plants, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, ASE1, and Gv3101 strains are preferably utilized. The gene(s) of interest can be transformed into the *Agrobacterium* by any means known in the art. For example, a DNA fragment modified to contain the gene(s) of interest can be inserted into the T-DNA of an *Agrobacterium* Ti plasmid which also contains genes required to generate the transformed state.

Other modifications of the *Agrobacterium* plasmid T-DNA can be made to assist in the transformation process. For example, to distinguish seedlings which are successfully transformed, a selectable marker gene can be incorporated into the T-DNA of *Agrobacterium* plasmid. Selectable marker genes useful in the transformation methods described herein include any selectable marker gene which can be incorporated into the *Agrobacterium* T-DNA and upon expression, can distinguish transformed from non-transformed progeny. Exemplary selectable markers include a neomycin transferase gene or phosphinothricin acetyl transferase (*bar*) gene. For example, a preferable selection marker is the *bar* gene encoding phosphinothricin acetyl transferase which confers resistance to phosphinothricin-based herbicides. Preferably, the selection marker gene and gene(s) of interest are incorporated into any vector suitable for use with transforming *Agrobacterium* strains. For example, the binary vector, pBI121 vector (Clontech, Palo Alto, CA) can be modified wherein a copy of a phosphinothricin acetyl transferase (*bar*) gene is inserted, under the control of a 35S promoter and octopine synthase 3' sequences, into the *Hind*III site of the T-DNA. The *bar* gene encodes phosphinothricin acetyl transferase which confers resistance to phosphinothricin-based herbicides, such as Ignite® (AgroEvo, Frankfurt, Germany). This selectable marker enables easy selection of transformed plants: upon spraying the



plants with phosphinothricin (PPT) containing herbicides, only transformed plants containing the *bar* gene survive exposure to the herbicide.

In the seedling transformation process, the starter seeds can be pretreated to optimize their germination and to prepare the resulting seedlings for transformation.

5 Surface-sterilization of the seeds is preferred to remove any interfering microorganisms which might infect the germinating seed. Any sterilization means which does not deleteriously affect the seeds can be used. Exemplary methods include use of aqueous 20-30% sodium hypochlorite or 70% ethanol. Preferably, the seeds are sterilized in a solution of 30% sodium hypochlorite and 0.1% Tween 20 for approximately 5 minutes

10 and then thoroughly rinsed to remove the sterilizing solution. Preferably, sterile double distilled or deionized water, or water with reduced oxidizable carbon following reverse osmosis, ion exchange and/or activated charcoal treatment is used to rinse the seeds. Some seeds, for example *M. truncatula*, experience a prolonged dormancy period resulting in delayed germination. These seeds can be treated by a scarification process

15 capable of breaking the dormancy. For example, cracking or scratching the seed coat, soaking the seed to soften the seed coat, or a controlled acid treatment can be utilized. Preferably, a treatment in concentrated sulfuric acid for approximately 10 minutes followed by thorough rinsing to remove the acid is utilized. Preferably, sterile double distilled or deionized water, or water with reduced oxidizable carbon following reverse

20 osmosis, ion exchange and/or activated charcoal treatment is used to rinse the seeds.

After pretreatment, the seeds are placed on a medium capable of supporting germination and subsequent growth of the seedlings. For example, the seeds can be placed on the surface of sterile filter paper or paper towels. Preferably, the seeds are spread on the surface of firm, sterile water agar in petri plates. The seeds are then

25 placed under environmental conditions capable of inducing germination and supporting development of seedlings. Vernalization may be preferred for certain plants such as *M. truncatula* to promote early flowering. Incubation of the resulting seedlings is continued until the seedlings reach an appropriate stage of development for vacuum infiltration. The optimum age of seedlings for vacuum infiltration varies for different

30 plants. In general, seedlings in which the radical has emerged and grown to at least about 1 cm are sufficiently mature. However, since plants develop at different rates,



vacuum infiltration can be optimized for a specific plant by screening seedlings at various stages of development using the methods disclosed herein and determining the stage at which the transformation efficiency is maximized. The time and temperature of incubation can also be adjusted to provide optimum conditions for a specific variety. For example, approximately 15 days after the seeds are placed on germination medium, *M. truncatula* and soybean seedlings are sufficiently matured for vacuum infiltration.

A few days prior to vacuum infiltration, the transforming *Agrobacterium* is subcultured on a general plated growth medium preferably containing appropriate antibiotics to distinguish transformed *Agrobacterium* cells. For example, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 and Gv1301 carrying the *bar* gene are preferably cultured on YEP medium as defined in Example 1 containing rifampicin (20mg/l) and kanamycin (50 mg/l). The *Agrobacterium* cultures are grown at about 28°C for about 2-3 days.

One day prior to the vacuum infiltration, a liquid *Agrobacterium* culture is prepared by aseptically transferring an appropriate inoculum into a general growth medium suitable for growing *Agrobacterium*. TY liquid medium and YEP liquid medium containing appropriate antibiotics to select for the transformed *Agrobacterium* are preferred for *Agrobacterium* EHA105 and Gv1301. The liquid cultures are grown under conditions which provide the *Agrobacterium* to reach exponential growth. Preferably, the liquid culture is incubated at about 28°C in a shaker incubator at about 250 rpm overnight. It is essential to use fresh *Agrobacterium* to achieve transformation.

To provide optimal conditions for transformation, the vacuum infiltration is preferably performed using the transforming *Agrobacterium* liquid culture in exponential growth phase ( $OD_{600} = 1.6$ ). The *Agrobacterium* cells in the liquid culture are pelleted by centrifugation and resuspended in two volumes of a vacuum infiltration medium (e.g., *Agrobacterium* cells grown in 15ml liquid culture, pelleted by centrifugation, and then resuspended in 30ml vacuum infiltration medium). Any plant growth medium capable of supporting the infiltration process and the *Agrobacterium* within the plant while being compatible with plant growth can be used as the vacuum





infiltration medium. More preferably, the vacuum infiltration medium comprises acetosyringone which induces the vir genes of the *Agrobacterium*. For leguminous plants, the vacuum infiltration medium defined in Examples 1 and 2 is preferably utilized.

5 To perform the vacuum infiltration, the seedlings are removed from the germination/incubation medium and placed in any clean container capable of holding several seedlings as well as a volume of vacuum infiltration medium to partially cover the seedlings. Petri plates are useful for this purpose, using about 30-40 seedlings per plate. The *Agrobacterium* suspension in the vacuum infiltration medium is added to the  
10 container to wet and partially cover the seedlings. For a standard petri plate, approximately 10ml of the suspension is sufficient. The petri plate containing the seedlings in *Agrobacterium* suspension is placed in a vacuum chamber. The preferred amount of vacuum to be used in the transformation process is the minimal amount necessary to force the *Agrobacterium* into the apoplastic spaces of the seedlings.  
15 Approximately 28mmHg was sufficient for transforming *M. truncatula* and soybean. The time and manner in which the vacuum is applied to the seedlings depends upon the plant and has to be determined empirically. The vacuum can be applied then released. Alternately, the vacuum can be applied, released, reapplied, and then released again. The duration of vacuum can vary from about 0.1 to about 5 min, more preferably from  
20 about 0.5 to about 2 min, and most preferably for about 1 min. For *M. truncatula*, plants held under vacuum for 0.5 min and for 2 min gave rise to transgenic plants, but plants held under vacuum for 1 min gave the maximum transformation efficiency.

Following vacuum infiltration, the *Agrobacterium* suspension is decanted, and the seedlings are blotted on sterile filter paper or blotting paper. The seedlings can then  
25 be planted into a complete soil mix that will allow full growth and development of the plant and the production of seed. The seedlings are then permitted to mature and set seed. Preferably, the plants are kept at a humidity, temperature, duration of photo period, and spectrum of light which favor plant growth. To increase the viability of the transformed plants and to improve the transformation efficiency, the seedlings are  
30 optionally incubated on a co-cultivation medium for 2-3 days prior to planting in a complete soil mix. Any co-cultivation medium which supports growth of the seedlings



can be used. For leguminous plants, the co-cultivation medium given in Examples 1 and 2 is preferred. The plants are then permitted to develop to maturity and set seed. A portion of the seeds will carry the transgene in their genomes. The seeds are germinated, and the resulting progeny which exhibit stable inheritance of the transgene are selected.

Several methods known in the art can be used to distinguish the progeny exhibiting stable inheritance of the transgene. For transgenic plants wherein the gene(s) of interest results in a visible phenotypic change, the selection can be based upon visual examination of the progeny. For plant transformations involving *Agrobacterium* carrying plasmids containing a selectable marker gene, the appropriate selectable agent can be applied to the plants to select the transformants. Optionally, Southern blot analysis or PCR analysis can be used to verify the presence of the transferred gene in the genome of the transformed plants.

The seedling transformation processes of the present invention are further illustrated in detail in the examples provided below. While these examples describe the invention, it is understood that modifications to the methods to optimize transformation of a specific plant are well within the skill of one in the art, and such modifications are considered within the scope of the invention.

#### Example 1: Transformation of *M. truncatula* by Vacuum-infiltration of Seedlings

*M. truncatula* seedlings were transformed to incorporate the *bar* gene and the *nptII* gene into the plant's genome using the transformation process of the present invention.

#### Preliminary

Prior to transformation, a modified version of the binary vector, pBI121 vector (Clontech, Palo Alto, CA) was made by inserting a copy of a phosphinothricin acetyl transferase (*bar*) gene, under the control of a 35S promoter and octopine synthase 3' sequences, into the *HindIII* site of the T-DNA to create a plasmid called pBI121-*bar* (Fig. 1). The construct was confirmed by restriction analysis and PCR analysis, and then transformed into an *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 (Hood, et al. 1993. "New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants," *Trans Res* 2:208-



218). Additional constructs in *Agrobacterium* were also obtained as given in Table III. While the following procedure is presented for the pBI121-*bar* in the EHA105 *Agrobacterium* strain, the same procedure was followed for the other constructs with the exception that the growth medium was supplemented with specific antibiotics necessary for maintaining the plasmid.

**Day 1:**

The *M. truncatula* seed was sterilized and germinated as follows. The seeds were soaked in conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for approximately 10 min. The acid was removed, and the seeds were rinsed extensively in sterile cold double distilled water. This treatment was used to break dormancy in *M. truncatula*.

The seeds were then surface-sterilized by soaking the seeds in a sterilizing solution such as 30% Clorox / 0.1% Tween 20 solution for approximately 5 min with gentle agitation. The seeds were rinsed extensively with sterile cold double distilled water.

The seeds were then spread on a firm water-agar (for example, 0.8%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in petri plates. The water-agar petri plates containing the seeds were wrapped with aluminum foil and kept at 4°C for 15 days. This vernalization step was used to promote early flowering of *M. truncatula*.

**About Day 12:**

*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 carrying pBI121-*bar* was subcultured for isolation onto a fresh agar plate containing YEP medium [1 liter: 10g Bacto-peptone (Difco, Detroit, MI); 10g yeast extract; 5g NaCl; and 15g Bacto-agar (Difco, Detroit, MI) at pH=6.8 without adjusting] containing rifampicin (20 mg/l) and kanamycin (50 mg/l), and the subculture was incubated at approximately 28°C for about 2-3 days.

**About Day 14:**

One loop, or approximately 3 large colonies of the *Agrobacterium* subculture was inoculated into about 15 ml TY liquid medium [1 liter: 5g tryptone, 3g yeast extract, 0.88g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O at pH=7] containing rifampicin (20 mg/l) and kanamycin (50 mg/l) and incubated on a 28°C shaker at 250 rpm overnight.



**About Day 15:**

The *Agrobacterium* liquid culture was grown until an exponential phase ( $OD_{600}$  1.6) was reached. The *Agrobacterium* cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 30 ml of vacuum-infiltration medium (VIM) [1 liter: 10ml PDM salt solution at 100X concentration (400ml at 100X: 100g  $KNO_3$ ; 12g  $NH_4H_2PO_4$ ; 16g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0.4g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ; 0.2g  $H_3BO_3$ ; 0.008g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; 0.04g KI; 0.004g  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 0.04g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , and 0.004g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ; filter sterilized and stored at room temperature); 10ml PDM iron and vitamins (1 liter at 100X: 0.5g nicotinic acid; 0.05g pyridoxine-HCl; 0.5g thiamine-HCl; 100g myo-inositol; 1.5g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; and 2g  $Na_2EDTA$ ; filter sterilized; stored for immediate use at 4°C; long term storage at -20°C); 0.2g  $CaCl_2 \cdot H_2O$ ; 1.5ml of 10mM benzylaminopurine (BAP; 0.0565g in 0.15ml 2N NaOH and 24.85ml double distilled  $H_2O$  stored at 4°C); 0.05ml of 10mM alpha-naphthaleneacetic acid (NAA; 0.0465g in 3ml 95% ethanol and 22ml 70% ethanol stored at 4°C); 10g sucrose; and 0.1ml acetosyringone (AS; 1M in DMSO stored at -20°C), wherein PDM salts, PDM iron and vitamins,  $CaCl_2 \cdot H_2O$  and sucrose are combined, the pH adjusted to 5.8 with KOH and autoclaved on liquid cycle for 20 min, and when the medium cools to 50°C, BAP, NAA, and AS are added].

The seedlings were removed from the water agar plates and placed in a clean standard petri dish at approximately at 30-40 *M. truncatula* seedling per petri plate. Approximately 10ml of the *Agrobacterium* suspension in the vacuum infiltration medium was added to the petri plate, a volume sufficient to wet and partially cover the seedlings. The petri plates containing the seedlings wetted with *Agrobacterium* suspension were placed in a vacuum chamber. Three methods of vacuum infiltration were tested. In Treatment 1, a vacuum was drawn to 28mmHg for approximately 1 min, released rapidly, redrawn to 28mmHg for approximately 1 min, and finally released rapidly. In Treatment 2, a vacuum was drawn to 28mmHg for approximately 1.5 min, released rapidly, redrawn to 28mmHg for approximately 1.5 min, and finally released rapidly. In Treatment 3, a vacuum was drawn to 28mmHg for approximately 40 seconds, held for 20 seconds, and finally released rapidly. For all treatments, the seedlings were then blotted on sterile filter paper or blotting paper and spread onto petri plates containing co-cultivation medium(CM) [1 liter: 10ml PDM salt solution at 10X





concentration; 10ml PDM iron and vitamins; 0.2g  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 10g sucrose; 7.5g agar-agar (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); and 0.1ml AS, wherein PDM salts, PDM iron and vitamins,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , agar-agar, and sucrose are combined, the pH adjusted to 5.8 with KOH and autoclaved on liquid cycle for 20 min, and when the medium cools to 50°C, AS is added]. The seedlings were incubated in a growth chamber under the conditions given in Table I for approximately 2-3 days.

Table I: Growth Chamber Conditions

	Temp. (°C)	Humidity (%)	Photo-period	Light
SET	20 (Day & Night)	90	16 hrs (8am-12midnight)	Top light only (1/2 fluorescent, no incandescent) 4 light bulbs Sylvania 115W, F48T1

**About Day 17:**

The seedlings were washed twice with  $\text{H}_2\text{O}$  and then planted in pots in Metro-mix 200 soil mixture. To allow the plants to adjust slowly to ambient humidity the following procedure was followed: the pots containing the seedlings were initially covered with a plastic cover; after one week, the cover was propped open, and after a couple of days, the cover was removed completely. The plants were allowed to mature under conditions that are suitable for optimal plant growth, i.e., at 22-25°C with eighteen hour days.

**About Day 40**

The plants began to flower at approximately 24 days after planting in soil. The resulting seeds were collected and germinated under conditions optimal for germination, i.e., a short cold treatment for four days on a damp filter paper, left at room temperature for 1-2 days, and then planted in soil. When the seedlings had a few leaves (approximately 15 days old), they were sprayed with 80 mg/L PPT (~1/7000 dilution of 600mg/ml solution stored at -20°C), and the results are presented below.



In this study, 120 *M. truncatula* seedlings were vacuum infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 carrying the pBI121-*bar* plasmid as described above. Three different treatments were used, and forty seedlings were infiltrated per treatment. The treatments varied only in the length of time of the vacuum infiltration treatment. The infiltrated plants were permitted to mature and set seed. The progeny seedlings were sprayed with Ignite (PPT) and resistant seedlings were further analyzed for the presence of the *bar*, *nptII* and B-Glucuronidase (GUS) genes. The results are shown in Table II. Fig. 2A, 2B, 3A, and 3B present data obtained in Experiments T-84-1, T84-2, and T84-3 of Table II. These results show the efficiency of transformation ranging from 2.9% to 27.6% for the various transformation experiments.

Table II: Transformants Resulting from Transformation of *M. truncatula* via Infiltration of Seedlings with *Agrobacterium*

Experiment <sup>a</sup>	Construct and <i>Agrobacterium</i> <sup>b</sup>	No. of Plants Infiltrated	Approx. No. of Seed Collected	No. of Seedlings Germinated	No. of Seedlings resistant to PPT	% transformation	% independent transformants (*)
T84-1	pBI121- <i>bar</i> /EHA105	40	1326	329	22	6.7	78
T84-2	pBI121- <i>bar</i> /EHA105	40	1263	302	16	5.3	ND <sup>c</sup>
T84-3	pBI121- <i>bar</i> /EHA105	40	1214	173	5	2.9	ND
T87-1	pGA482- <i>bar</i> /EHA105	40	ND	217	10	4.6	86
T87-2	pGA482- <i>bar</i> /EHA105	40	ND	502	89	17.7	78
T87-3	pKYLX71Gus /EHA105	40	ND	ND	**	ND	ND
T87-4	pBINmgfp- <i>ER-bar</i> / EHA105	40	ND	382	13	3.4	8
T87-7	pBINmgfp- <i>ER-bar</i> and pKYLX71Gus / EHA105	40	ND	210	58	27.6	ND
T88	pSKI015/ Gv3101	70	ND	565	40	7.1	ND



<sup>a</sup> The following treatment methods were used: T84-1, T87-1, T87-2, T87-3, T87-4, T87-7, and T88, infiltration for 1 min (2X); T84-2, infiltration for 1.5 min (2X); T84-3, infiltration for 40 sec and hold 20 sec.

<sup>b</sup> The following *Agrobacterium tumefaciens* strains and binary vectors were used in these experiments: *A. tumefaciens* strain ASE1 carrying the binary vectors pSLJ525 (Jones et al. 1992. "Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants," *Trans. Res.* 1: 285-297) or pSKI006 (<http://www.salk.edu/LABS/pbio-w/>). *A. tumefaciens* strain EHA105, carrying pBI121-*bar* or PKYLX7-Gus (Franklin et al. 1993 "Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer," *Plant Cell Rep* 12:74-79), or pBINmgfp-ER-*bar*, or pGA482-*bar*. *A. tumefaciens* strain Gv3101 carrying pSKI015 (Kardailsky et al. 1999. "A pair of related genes with antagonistic roles in floral induction," *Science* 286, 1962-1965). The addition of the *bar* gene to a number of vectors was achieved as follows. A *Hind*III/*Hpa*I fragment containing the 35S-*bar*-OCS 3' sequences cassette was excised from pSLJ525 and inserted between the *Hind*III and *Hpa*I sites of pGA482 to create pGA482-*bar*. The same *Hind*III/*Hpa*I fragment was used to produce pBI121-*bar* and pBINmgfp-ER-*bar*. For each of these vectors, the *Hpa*I site was converted to a *Hind*III site by the addition of an *Hpa*I-*Hind*III linker and then the *Hind*III fragment was then inserted into the *Hind*III site of pBI121 or pBINmgfp-ER (Haseloff et al. 1997 "Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2122-2127/1997) to create pBI121-*bar* and pBINmgfp-ER-*bar* respectively.

<sup>c</sup> ND=not determined.

Transformed plants from Treatments T84-1, T84-2, and T84-3 were also analyzed by Southern blot analysis to demonstrate the presence of the transgene within the plant. DNA was isolated from 22 transgenic plants (12 plants from Treatment T84-1, 6 plants from Treatment T84-2, and 4 plants from Treatment T84-3) and digested with restriction enzyme *Hind*III. The digested DNA was separated by electrophoresis and blotted to nylon membranes. The membranes were probed with an internal DNA fragment (450bp) of the *bar* gene labeled with <sup>32</sup>P-dATP. All of the transformed plants



contained DNA fragments that hybridized to the *bar* probe indicating that this gene is integrated into the genome (Fig. 2A and 2B). The plasmid pBI121-*bar* DNA was included on the blot as a positive control, and a sample of DNA from non-transformed *M. truncatula* plant was included as a negative control. As expected the *bar* probe hybridized to the plasmid DNA but not to the DNA from the non-transformed *M. truncatula* plant (Fig. 2A and 2B). The expected size of the hybridizing fragment from the plasmid is 1.6kb; however, all of the fragments were larger, probably due to a rearrangement towards the left border. The blots were stripped and reprobed with an internal fragment of the *nptII* gene (766bp) labeled with <sup>32</sup>P-dATP. The *nptII* gene is carried on the pBI121-*bar* plasmid, between the right border of the T-DNA and the *bar* gene (Fig. 1). All of the transformed plants contained DNA fragments that hybridized to the *nptII* probe indicating that this gene is also integrated into the genome. This combination of digest and probe provided a right border analysis and demonstrated the presence of independent transformants. For example, the unique *bar*-hybridizing fragments shown with Transformants 1.6, 1.10, 1.11, 1.14, 1.13, and 2.12 provided evidence that these are independent transformants. Again, the non-transformed control plant does not contain DNA capable of hybridizing to this probe (Fig. 3A and 3B). The pBI121-*bar* T-DNA also contains a copy of the GUS gene between the *bar* gene and the left border (Fig. 1); however, this gene could not be detected in the transformed plants. Loss of genes located between the selectable marker and the left border have been previously reported; thus, the lack of the GUS gene in the transformed plants confirmed these findings. These results were consistent with the *bar* Southern analysis and offered an explanation of the larger than expected *bar* hybridizing fragment. Thus, it was demonstrated that the GUS gene or any gene of interest must be inserted in the plasmid between the *bar* gene and the right border (at the location of the *nptII* gene) to ensure integration.

Seed from the transgenic plants were collected and germinated, and the resulting seedlings were sprayed with PPT herbicide. The progeny of the transgenic plants were also highly resistant to PPT, indicating that the transgenes are stable and inherited by the following generation. As shown in Table III, data was obtained which





showed that the transgenes were inherited in a stable Mendelian fashion. The results show that the lines can be propagated past the T1 generation.

Table III: Segregation Analysis (Phosphinothricin Resistance) of Progeny from a Selection of Transformants Prepared by Infiltration of Seedlings

Progeny from transformants	Number of plants resistant to phosphinothricin (R)	Number of plants sensitive to phosphinothricin (S)	Chi-square test against ratios (p) <sup>a</sup>		
			3R:1S	15R:1S	63R:1S
T84-1.14	83	0	-	*	**
T84-1.19	44	20	**	-	-
T84-1.20	38	14	**	-	-
T84-2.6	44	21	**	-	-

<sup>a</sup> \*\* = p value of  $\geq 0.05$ ; \* = p value of  $\geq 0.01$ ; - = p value of  $\leq 0.01$ .

#### Example 2: Transformation of Soybean by Vacuum-infiltration of Seedlings

Soybean seedlings were transformed to incorporate the *bar* gene into the plant's genome using the transformation process of the present invention.

#### Day 1:

The seeds were then surface-sterilized by soaking the seeds in 20% sodium hypochlorite for approximately 5 min with gentle agitation. The seeds were rinsed for eight times in sterile double distilled water. The seeds were then placed in a large volume of water and allowed to imbibe at room temperature for 3-12 hours.

The seeds were then spread on a firm water-agar (for example, 0.8%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in petri plates. The water-agar petri plates containing the seeds were wrapped with aluminum foil and kept at 18-20°C for 15 days.

#### About Day 12:

*Agrobacterium tumefaciens* Gv3101 which carries the SKI015 vector with a copy of the *bar* gene was subcultured for isolation onto a fresh agar plate containing YEP medium [1 liter: 10g Bacto-peptone (Difco); 10g yeast extract; 5g NaCl; and 15g Bacto-agar (Difco) at pH=6.8 without adjusting] containing rifampicin (10 mg/l),



kanamycin (50 mg/l), carbenicillin (50 mg/l), and gentamicin (20 mg/l), and the subculture was incubated at approximately 28°C for about 2-3 days.

**About Day 14:**

One loop, or approximately 3 large colonies of the *Agrobacterium* subculture was inoculated into about 15 ml TY liquid medium [1 liter: 5g tryptone, 3g yeast extract, 0.88g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  at pH=7] containing rifampicin (10 mg/l), kanamycin (50 mg/l), carbenicillin (50 mg/l), and gentamicin (20 mg/l) and incubated on a 28°C shaker at 250 rpm overnight.

**About Day 15:**

The *Agrobacterium* liquid culture was grown until an exponential phase ( $\text{OD}_{600}$  1.6) was reached. The *Agrobacterium* cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 30 ml of vacuum-infiltration medium (VIM) [1 liter: 10ml PDM salt solution at 10X concentration; 10ml PDM iron and vitamins; 0.2g  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1.5ml of 10mM benzylaminopurine (BAP; 0.0565g in 0.15ml 2N NaOH and 24.85ml double distilled  $\text{H}_2\text{O}$  stored at 4°C); 0.05ml of 10mM alpha-naphthaleneacetic acid (NAA; 0.0465g in 3ml 95% ethanol and 22ml 70% ethanol stored at 4°C); 10g sucrose; and 0.1ml acetosyringone (AS; 1M in DMSO stored at -20°C), wherein PDM salts, PDM iron and vitamins,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  and sucrose are combined, the pH adjusted to 5.8 with KOH and autoclaved on liquid cycle for 20 min, and when the medium cools to 50°C, BAP, NAA, and AS are added].

The seedlings were removed from the water agar plates and placed in a clean standard petri dish at approximately at 10-20 soybean seedlings per petri plate. Approximately 20ml of the *Agrobacterium* suspension in the vacuum infiltration medium was added to the petri plate, a volume sufficient to wet and partially cover the seedlings. The petri plates containing the seedlings wetted with *Agrobacterium* suspension were placed in a vacuum chamber. A vacuum was drawn to 28mmHg for approximately 2 min, released rapidly, redrawn to 28mmHg for approximately 2 min, and finally released rapidly. The seedlings were then blotted on sterile filter paper or blotting paper and spread onto petri plates containing co-cultivation medium(CM) [1 liter: 10ml PDM salt solution at 10X concentration; 10ml PDM iron and vitamins; 0.2g



CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O; 10g sucrose; 7.5g agar-agar (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); and 0.1ml AS, wherein PDM salts, PDM iron and vitamins, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, agar-agar, and sucrose are combined, the pH adjusted to 5.8 with KOH and autoclaved on liquid cycle for 20 min, and when the medium cools to 50°C, AS is added]. The seedlings were incubated in a growth chamber under the conditions given in Table IV for approximately 6-7 days until the *Agrobacterium* could be seen growing around the seedlings on the media.

Table IV: Growth Chamber Conditions

	Temp. (°C)	Humidity (%)	Photo-period	Light
SET	20 (Day & Night)	90	16 hrs (8am-12midnight)	Top light only (1/2 fluorescent, no incandescent) 4 light bulbs Sylvania 115W, F48T1

#### About Day 17:

The seedlings were washed twice with H<sub>2</sub>O and then planted in pots in Metro-mix 200 soil mixture. To allow the plants to adjust slowly to ambient humidity the following procedure was followed: the pots containing the seedlings were initially covered with a plastic cover; after one week, the cover was propped open, and after a couple of days, the cover was removed completely. The plants were allowed to mature under conditions for optimal growth in a greenhouse.

#### About Day 40

The plants began to flower, and the resulting seeds were collected and germinated by soaking in water for three hours followed by immediate planting in soil. When the seedlings had one leaf, they were sprayed with 100 ml/l PPT (~1/6000 dilution of 600mg/ml solution in 0.1% Tween 20 stored at -20°C), and the results are presented below.

In this study, 30 soybean seedlings were vacuum infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* strain Gv3101 carrying the SKI015-*bar* plasmid as described above.

Fourteen of the thirty infiltrated soybean seedlings survived, were transplanted into



5 pots, and allowed to mature and set seed. Approximately 700 progeny seeds were collected, germinated and grown in vermiculite. After the seedlings developed at least one true leaf, they were sprayed with PPT herbicide. PCR analysis was performed to confirm that the plants which survived the PPT herbicide carried the *bar* gene in their genomes. DNA was extracted from each surviving plant and used as a template in a PCR reaction with *bar* specific primers. A fragment of the expected size was amplified from the DNA samples from at least eleven of the transformed plants, indicating that these plants had been transformed. The frequency of transformation was around 1.57%.

10 In summary, the seedling transformation process described herein is more efficient and less labor intensive than previously reported methods. In addition, somatic alterations are avoided, and direct introduction of genetic material into elite lines is made possible. Large numbers of transgenic plants representing diverse integration events can be generated very rapidly and efficiently, and the transgenes are  
15 stable and inherited by the subsequent generation. The major difficulty with regeneration of *Agrobacterium* transformed cells through tissue culture is avoided in the transformation procedures of the present invention, making it useful for legumes such as, soybean, bean and peas for which subsequent regeneration of *Agrobacterium* transformed cells is problematic.





## WE CLAIM:

1. A method for direct plant transformation using seedlings and *Agrobacterium* comprising:

(a) contacting at least one seedling with *Agrobacterium* cells, said *Agrobacterium* cells harboring a vector, said vector enabling said *Agrobacterium* cells to transfer T-DNA containing at least one gene or gene fragment to said seedling;

(b) applying a vacuum to said seedling in contact with said *Agrobacterium* cells at a first time, said vacuum of sufficient strength to force said *Agrobacterium* cells into intimate contact with said seedling such that said *Agrobacterium* cells transfer said T-DNA to cells of said seedling at a second time, wherein said first and second time are the same or different.

2. The method of Claim 1, further comprising:

(c) allowing said seedling to grow to maturity and set seed;

(d) germinating said seed to form progeny; and

(e) selecting for progeny expressing said transferred gene.

3. The method of Claim 1, wherein said vector comprises a selectable marker gene.

4. The method of Claim 2, wherein said vector comprises a selectable marker gene.

5. The method of Claim 3, wherein said selectable marker gene comprises a herbicide resistance gene.

6. The method of Claim 4, wherein said selectable marker gene comprises a herbicide resistance gene.

7. The method of Claim 5, wherein said herbicide resistance gene comprises a *bar* gene.

8. The method of Claim 6, wherein said herbicide resistance gene comprises a *bar* gene.



9. A method for direct plant transformation using seedlings and *Agrobacterium* comprising:

(a) contacting at least one seedling with a mixture of *Agrobacterium* cells, said mixture comprising cells from a *Agrobacterium* strain harboring a vector with a DNA fragment and cells from said *Agrobacterium* strain harboring said vector a second DNA  
5 fragment, said vector enabling said *Agrobacterium* cells to transfer said T-DNA to said seedling;

(b) applying a vacuum to said seedling in contact with said *Agrobacterium* cells at a first time, said vacuum of sufficient strength to force said *Agrobacterium* cells into  
10 intimate contact with said seedling such that said *Agrobacterium* cells transfer T-DNA to cells of said seedling at a second time, wherein said first and second time are the same or different.

10. The method of Claim 9, further comprising:

- (c) allowing said seedling to grow to maturity and set seed;
- (d) germinating said seed to form progeny; and
- (e) selecting for progeny expressing said transferred gene.

11. The method of Claim 9, wherein said vector comprises a selectable marker gene.

12. The method of Claim 10, wherein said vector comprises a selectable marker gene.

13. The method of Claim 11, wherein said selectable marker gene comprises a herbicide resistance gene.

14. The method of Claim 12, wherein said selectable marker gene comprises a herbicide resistance gene.

15. The method of Claim 13, wherein said herbicide resistance gene comprises a *bar* gene.

16. The method of Claim 14, wherein said herbicide resistance gene comprises a *bar* gene.



18. A method for direct plant transformation using seedlings and *Agrobacterium* comprising:

(a) contacting at least one seedling with *Agrobacterium* cells, said *Agrobacterium* cells harboring a vector, said vector enabling said *Agrobacterium* cells to transfer T-DNA containing at least one gene or gene fragment and a selectable marker gene to said seedling;

(b) applying a vacuum to said seedling in contact with said *Agrobacterium* cells at a first time, said vacuum of sufficient strength to force said *Agrobacterium* cells into intimate contact with said seedling such that said *Agrobacterium* cells transfer said T-DNA to cells of said seedling at a second time, wherein said first and second time are the same or different;

(c) allowing said transformed seedling to grow to maturity and set seed;

(d) germinating said seed to form progeny;

(e) exposing said progeny to an agent enabling detection of selectable marker gene expression;

(f) selecting for progeny expressing said selectable marker gene and at least one gene, said expression of said selectable marker gene and at least one gene indicating gene transfer.

19. The method of Claim 18, wherein said selectable marker gene comprises a herbicide resistance gene.

20. The method of Claim 19, wherein said herbicide resistance gene comprises a *bar* gene.

21. A plant transformed according to the method of Claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20.

22. Seed from a plant transformed according to the method of Claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20.

23. A progeny plant from a seed obtained from a plant transformed according to the method of Claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20.



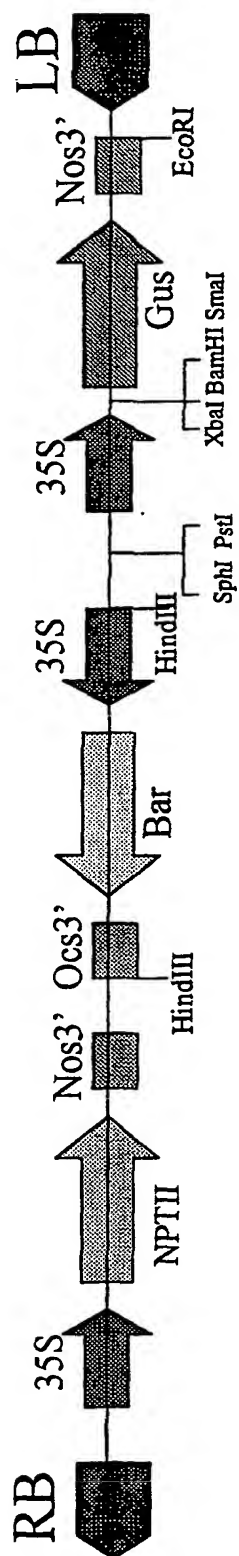


Fig.1





pBI121-bar

C 1.3 1.4 1.5 1.8 2.2 2.4 2.6 2.7 3.1 3.3 3.4 3.5



Fig.2a



3/6

pBII21-bar

C 1.3 1.4 1.5 1.8 2.2 2.4 2.6 2.7 3.1 3.3 3.4 3.5

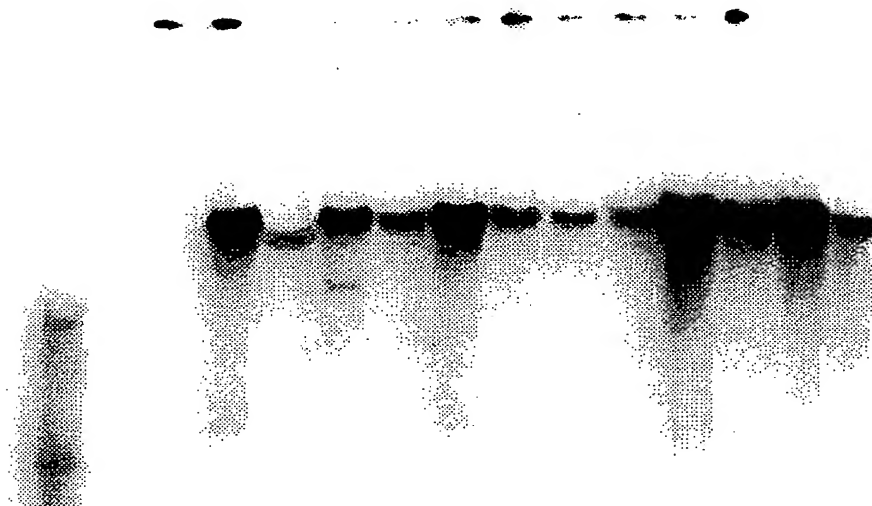


Fig.2b



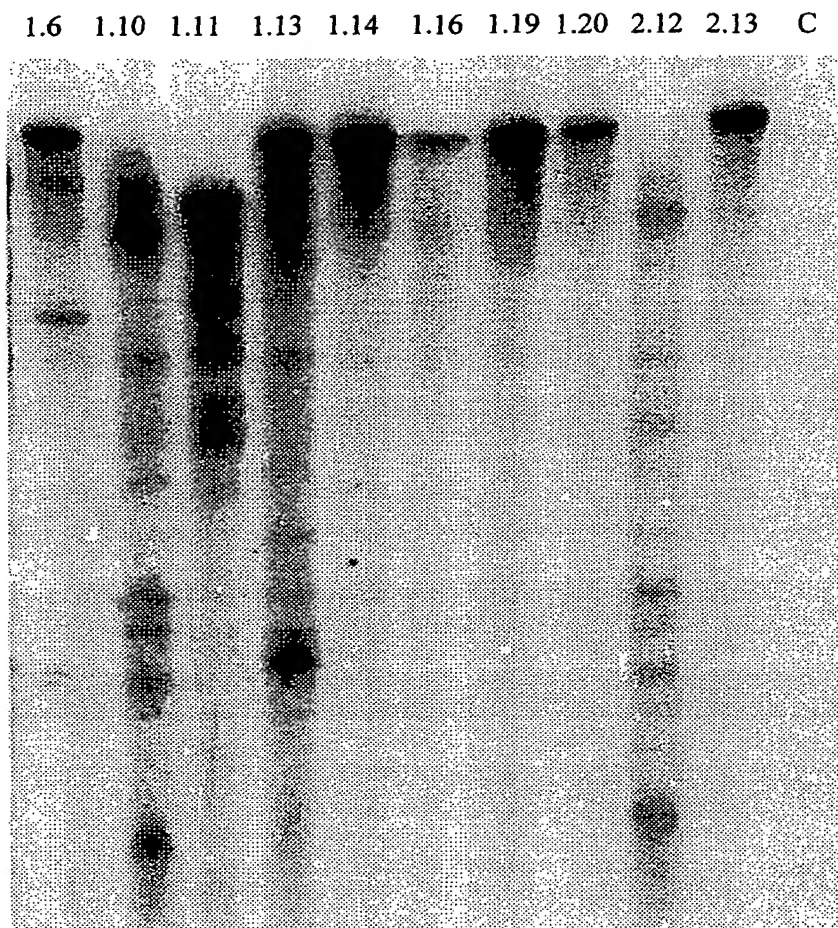


Fig.3a



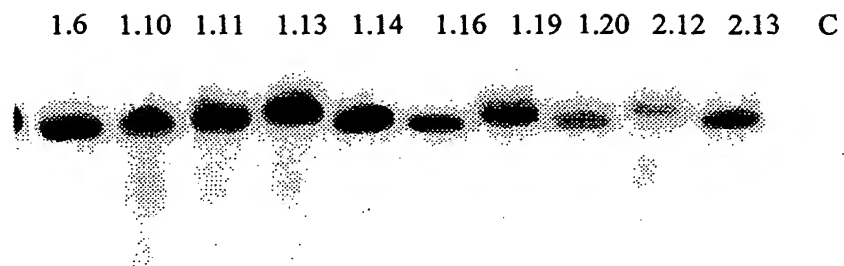


Fig.3b

11



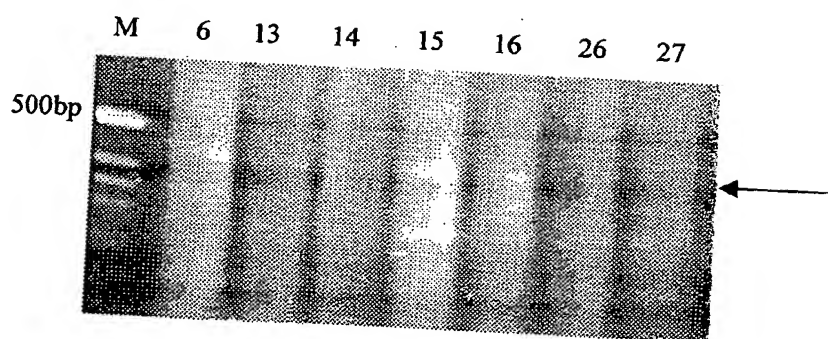


Fig. 4



## SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation

HAROLD N. TRICK and JOHN J. FINER\*

Department of Horticulture and Crop Science, Plant Molecular Biology and Biotechnology Program, Ohio Agricultural Research and Development Center, The Ohio State University, Wooster, OH 44691 USA (Fax: +1 330 263 3887)

Received 13 January 1997; revised 18 March 1997; accepted 18 March 1997

Plant transformation via *Agrobacterium* can be limited by both host specificity and the inability of *Agrobacterium* to reach the proper cells in the target tissue. Described here is a new and efficient *Agrobacterium*-based transformation technology that overcomes these barriers and enhances DNA transfer in such diverse plant groups as dicots, monocots, and gymnosperms. This new technology, called sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation (SAAT), involves subjecting the plant tissue to brief periods of ultrasound in the presence of *Agrobacterium*. Scanning electron and light microscopy reveal that SAAT treatment produces small and uniform fissures and channels throughout the tissue allowing the *Agrobacterium* easy access to internal plant tissues. Unlike other transformation methods, this system has the potential to transform meristematic tissue buried under several cell layers. SAAT increases transient transformation efficiency in several different plant tissues including leaf tissue, immature cotyledons, somatic and zygotic embryos, roots, stems, shoot apices, embryogenic suspension cells and whole seedlings. A 100- to 1400-fold increase in transient  $\beta$ -glucuronidase expression has been demonstrated in various tissues of soybean, Ohio buckeye, cowpea, white spruce, wheat and maize. Stable transformation of both soybean and Ohio buckeye has been obtained using SAAT of embryogenic suspension culture tissues. For soybean, SAAT treatment was necessary to obtain stable transformation with this tissue.

**Keywords:** *Agrobacterium*; SAAT; sonication; transformation; wounding

### Introduction

Over the past few years, there has been a resurgence of interest in the use of *Agrobacterium* to produce transgenic plants. Although plant tissue can be transformed using a variety of different direct naked DNA uptake methods (Finer *et al.*, 1996), the DNA integration patterns from direct DNA uptake methods are often random and largely unpredictable (Hadi *et al.*, 1996). With *Agrobacterium*-mediated transformations, although DNA integration patterns can be strain dependent (Tinland and Hohn, 1995), they are generally much simpler and gene expression may therefore be more consistent.

Monocots and certain dicot tissues are not very receptive to *Agrobacterium*-mediated transformation. Both the bacterium and the target tissue can be manipulated to obtain and enhance transformation with

these plants. Acetosyringone, an inducer of T-DNA transfer (Stachel *et al.*, 1985), enhances the transformation process and is now routinely added in transformation experiments. In addition, modifications to the binary vector in *Agrobacterium* have enabled fairly efficient transformation of rice (Hiei *et al.*, 1994) and maize (Ishida *et al.*, 1996).

The addition of anti-oxidants to the co-culture medium enhances transformation rates by reducing the hypersensitive response (Perl *et al.*, 1996), while different methods of wounding the target plant tissue have also been successfully employed to increase *Agrobacterium* infection. Wounding is an integral step in *Agrobacterium*-mediated transformation as it allows the bacterium to infect the target tissue. In addition, the wounded tissue often produces inducers of the T-DNA transfer process (Stachel *et al.*, 1985). The type or method of wounding ranges from simple wounds made during the normal course of explant preparation (Horsch *et al.*, 1985) to

\*To whom correspondence should be addressed.



particle gun-mediated micro-wounding (Bidney *et al.*, 1992). Tissues can also be wounded using *Agrobacterium*-filled syringes which allows some degree of 'delivery' of the bacterium to the target tissue (Chee *et al.*, 1989).

One approach, not sufficiently explored, is the use of sonication to wound and modify the target tissue to enhance *Agrobacterium* infection. There are a few reports of transformation of plant tissue using sonication with naked DNA (Joersbo and Brunstedt, 1990, 1992; Zhang *et al.*, 1991), but sonication has never been used to effectively enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of plant tissue.

For this work, the use of sonication with *Agrobacterium* was evaluated. The effects of sonication on the target tissue and the interaction of the introduced bacterium with the target tissue were examined using both light and scanning electron microscopy.

## Materials and methods

### Plant tissue preparation

Soybean (*Glycine max* Jack) and cowpea (*Vigna unguiculata*) plants were grown in the greenhouse under 16:8 h photoperiod at 27 °C. Immature soybean pods and leaflets of cowpea were surface-sterilized in a 20% commercial bleach solution containing 0.02% Tween-20, with slight agitation for 20 minutes and then rinsed 3 times with sterile distilled water. Leaf tissue of cowpea was used directly while immature cotyledons from soybean embryos, 4–6 mm in length, were excised and collected for treatment.

Maize (*Zea mays* A632) plants were grown either under standard greenhouse conditions or in the field. The immature embryos from self-pollinated plants were collected 9 to 21 days after anthesis and surface sterilized as above.

Wheat (*Triticum aestivum* Bobwhite) and white spruce (*Picea glauca*) seeds were surface-sterilized as above and plated on 0.5 × OMS medium containing half-strength Murashige and Skoog (MS) salts (Murashige and Skoog, 1962), half-strength B5 vitamins (Gamborg *et al.*, 1968), 1.5% sucrose and 0.2% Gelrite for germination.

Embryogenic suspension culture tissue of soybean (Chapman) was initiated and maintained as described previously (Finer and Nagasawa, 1988). Embryogenic cultures of the Ohio buckeye (*Aesculus glabra*) were initiated from seedling stem tissue cultured on a medium containing MS salts, B5 vitamins, kinetin (2 mg l<sup>-1</sup>), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (2 mg l<sup>-1</sup>), 3% sucrose and solidified with 0.2% Gelrite (pH 5.7). One to two months following induction, embryogenic buckeye tissue was transferred to liquid FN medium (Finer and Nagasawa, 1988) for establishment of suspension cul-

tures. Embryogenic suspension cultures of Ohio buckeye were maintained on a biweekly to monthly subculture regime.

### *Agrobacterium* and plasmid DNA

*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Hood *et al.*, 1993) containing either pIG121Hm (Hiei *et al.*, 1994) or Vec035 was used. Vec035 was used with tissue of soybean, buckeye and cowpea while pIG121Hm was used with tissues of maize, wheat and white spruce. The *Agrobacterium* plasmid Vec035 (generously provided by Tim Hall and David Frisch, Texas A&M University) was made by replacing the GUS gene in the HPT version of pBIG (Becker, 1990) with the intron-containing GUS gene from p35SGUSINT (Vancanneyt *et al.*, 1990). Vec035 contains the coding region for hygromycin resistance under regulatory control of the NOS promoter and an intron-containing GUS gene driven by the CaMV35S promoter. pIG121Hm contains both a hygromycin resistance gene and an intron-containing GUS gene, each under regulatory control of CaMV35S promoters.

Log phase *Agrobacterium* cells were grown overnight in modified LB medium containing NaCl (5 g l<sup>-1</sup>), sucrose (5 g l<sup>-1</sup>) and kanamycin (50 µg ml<sup>-1</sup>), centrifuged at 1500 g for 10 min, resuspended in liquid plant culture medium, recentrifuged as above, and finally resuspended in liquid plant culture medium. Different liquid culture media, based on the medium used to culture the plant tissues, were used to resuspend bacterial cells. Bacteria were then diluted to an OD<sub>600nm</sub> between 0.01 and 0.5 with liquid medium.

### Tissue sonication and co-culture

Soybean cotyledons were transferred to 1.5 ml microcentrifuge tubes, containing 0.5 ml *Agrobacterium* suspension in liquid D40 medium (Santarem *et al.*, 1997) which contains MS salts, B5 vitamins, 6% sucrose and 2,4-D (40 mg l<sup>-1</sup>) (pH 7.0). Cotyledons were suspended by mild agitation and the microcentrifuge tubes were then placed in a Styrofoam float at the centre of a bath sonicator (Model PC5, L&R Manufacturing Co., Kearny, NJ, USA) which was controlled with an electronic photographic timer. Cotyledons were treated for various timed intervals (from 0.2 s to 10 s) using both horizontal and vertical wave generator outputs. Soybean cotyledons were removed from the microcentrifuge tube, placed on a sterile filter paper to blot off excess bacteria, and then transferred flat side (adaxial side) up to semi-solid D40 medium containing 0.2% Gelrite and 100 µM acetosyringone (AS). After two days of co-culture, cotyledons were washed in sterile distilled water, blot-dried on sterile filter paper, and placed (flat side up) onto semi-solid D40 medium containing cefotaxime (350–500 mg l<sup>-1</sup>). After an additional two days on the medium containing antibiotics, the tissue was analysed for GUS activity.



Cowpea leaf pieces were placed in 50 ml conical polypropylene tubes containing *Agrobacterium*, resuspended in a medium containing MS salts, B5 vitamins, benzyl adenine (BA) ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) and naphthalene acetic acid (NAA) ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ), and sonicated similarly to the soybean cotyledons for 0 to 60 s. Leaf pieces were then blotted with filter paper and placed on a medium containing MS salts, B5 vitamins, 3% sucrose, BA ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ), NAA ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ),  $100 \mu\text{M}$  AS and 0.2% Gelrite (pH 5.7) (CM medium) for two days. Cowpea leaf tissues were transferred to CM medium containing cefotaxime ( $500 \text{ mg l}^{-1}$ ) for two days, and then assayed for GUS expression.

Immature zygotic embryos of maize were placed in a 1.5 ml microfuge tube containing 1 ml of an *Agrobacterium* suspension diluted with 2T2S medium containing MS salts, B5 vitamins, 2% sucrose, and 2,4-D ( $2 \text{ mg l}^{-1}$ ) (pH 5.7) to an  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0.1 to 0.5. Embryos were treated for 0 to 30 s. After a 5 min incubation, the embryos were blot-dried on filter paper and co-cultured scutellum side up on 2T2S medium containing  $100 \mu\text{M}$  AS and 0.2% Gelrite, pH 5.7 for three to five days. After co-culture, the embryos were placed on 2T2S medium containing Timentin<sup>®</sup> ( $400 \text{ mg l}^{-1}$ ) and 0.2% Gelrite, pH 5.7 for two to seven days before assaying for GUS expression.

Five-day-old wheat seedlings were placed in  $150 \times 23 \text{ mm}$  borosilicate tubes with 10 ml of an *Agrobacterium* suspension diluted with liquid  $0.5 \times \text{OMS}$  medium and sonicated for 0 or 100 s. Seedlings were co-cultured for three days on  $0.5 \times \text{OMS}$  medium containing  $100 \mu\text{M}$  AS and then transferred to  $0.5 \times \text{OMS}$  medium containing Timentin<sup>®</sup> ( $400 \text{ mg l}^{-1}$ ). Wheat seedlings were assayed for transient GUS expression five days after sonication.

Fourteen-day-old white spruce seedlings were placed in  $13 \times 100 \text{ mm}$  borosilicate tubes with 2 ml of an *Agrobacterium* suspension, diluted with  $0.5 \times \text{OMS}$  medium. Tissues were sonicated for 0 or 50 s, blotted on sterile filter paper and then co-cultured for three days in a medium containing B5 salts and vitamins (Gamborg *et al.*, 1968), 2% sucrose,  $10 \text{ mg l}^{-1}$  BA ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ), indole-3-butyric acid (IBA) ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ), and  $100 \mu\text{M}$  AS (pH 5.7). Samples were transferred to the same medium devoid of AS but containing cefotaxime ( $500 \text{ mg l}^{-1}$ ) for four days and then analysed for transient GUS expression.

Ten clumps of highly embryogenic soybean suspension culture tissue (2–4 mm in diameter), grown in FN medium, were transferred to sterile  $13 \times 100 \text{ mm}$  borosilicate glass tubes. *Agrobacterium* suspension (1 ml) diluted to  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  0.5 in FN medium, was added to the clumps and the tissue was SAAT-treated for 0 to 60 s. After SAAT treatment, the tissue was blotted on filter paper and transferred to 30 ml FN liquid medium in a baffled 125 ml DeLong flask containing  $100 \mu\text{M}$  AS.

After 2 days of co-culture, the medium was removed from the flasks and replaced with fresh FN medium containing Timentin<sup>®</sup> ( $400 \text{ mg l}^{-1}$ ). Transient GUS expression was assayed two to five days after SAAT treatment. Embryogenic buckeye tissue was SAAT-treated in the same way as soybean suspension culture tissue except that the embryogenic clumps were sonicated in 1.5 ml microfuge tubes.

#### Stable transformation

For stable transformation of soybean and Ohio buckeye, embryogenic suspension culture tissues of soybean and Ohio buckeye were SAAT-treated for 30 and 60 s respectively. After a 2 day co-culture in FN medium containing  $100 \mu\text{M}$  AS, suspension culture tissue was subcultured to FN medium containing Timentin<sup>®</sup> ( $400 \text{ mg l}^{-1}$ ) every week for two weeks. Hygromycin was then added to FN medium containing Timentin<sup>®</sup> ( $400 \text{ mg l}^{-1}$ ) at a concentration of  $20 \text{ mg l}^{-1}$  for soybean and  $10 \text{ mg l}^{-1}$  for buckeye. The culture medium was replaced every week for four weeks to prevent extensive browning of the medium. Transgenic clones were observed and isolated six to eight weeks following SAAT treatment. Stably-transformed soybean plants were regenerated from suspension culture material according to Finer and McMullen (1991).

#### $\beta$ -glucuronidase assays

GUS expression was assayed by placing cotyledons in GUS assay mix (Jefferson, 1987) containing 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.1% Triton X-100, 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 M  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronic acid (X-glu) ( $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and incubating overnight with gentle agitation at  $37^\circ\text{C}$ . The cells and tissues containing and expressing the introduced DNA (the GUS gene) were then scored by counting the number of blue spots or estimating the percentage of the surface area that was blue.

#### Microscopy

For microscopic analyses, samples of SAAT-treated soybean cotyledons were fixed in 3% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 1.5% acrolein, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 for a minimum of 2 h and dehydrated in an ethanol series. For scanning electron microscopy, tissues were critical point dried, sputter coated and viewed by an ISI40 scanning electron microscope. For light microscopy, immature soybean cotyledons were embedded in Spurr's resin, sectioned to  $0.75 \mu\text{m}$  and stained with 0.1% toluidine blue (Finer and McMullen, 1991).

#### Molecular analyses

DNA from transformed soybean and buckeye clones were isolated using the CTAB procedure (Saghai-Marooof *et al.*, 1984). DNAs were digested with *Hind*III and then





electrophoresed through a 0.8% agarose gel. The gel was treated and the DNA was transferred to nylon membranes and hybridized as described previously (Finer and McMullen, 1991). Membranes were placed on Kodak XAR-5 film with intensifying screens at  $-70^{\circ}\text{C}$  to visualize the hybridization pattern.

### Results and discussion

In all tissues tested, the SAAT treatment greatly enhanced the levels of transient expression (Table 1, Fig. 1). In most tissues, transient expression without sonication was very low, with no GUS expression being observed in tissues of wheat and white spruce seedlings as well as soybean and buckeye suspension cultures. With SAAT, transient expression was so high in areas of some tissues that individual foci could not be distinguished (Fig. 1) and it was necessary to estimate the percent of the surface that was GUS-positive. Although tissues responded to a wide range of SAAT durations (Table 2), the tissue was often damaged by the longer SAAT treatments and the tissue culture response was reduced (data not shown). The treatments that yielded high levels of GUS expression with a minimum SAAT duration were most desirable. As tissues differed in their response to SAAT (Table 1), the best treatment for each tissue needs to be empirically determined.

To determine the basis for the increase in transient GUS expression from SAAT, tissues were examined microscopically after SAAT treatment. Scanning electron microscopy revealed the formation of large numbers of micro-wounds on the surface of the SAAT-treated tissues, while the surface of the non-treated tissue was smooth and intact (Fig. 2). Micro-wounds were observed on all treated tissues and became larger with the longer duration treatments. These micro-wounds apparently resulted from cavitation, which is caused by sonication.

Cavitation can be both transient and stable. During

transient cavitation, small bubbles are formed, which enlarge and oscillate in size until they reach a critical size and implode. These implosions generate shock waves, which are strong enough to cause mechanical damage to both cells and macromolecules (Suslick, 1988). Stable cavitation results in the formation of larger bubbles, which rapidly oscillate in size, causing a strong and rapid movement of the medium surrounding the bubbles (microstreaming). High velocities of microstreaming result in mechanical damage to plant tissue and macromolecules (Frizzel, 1988). It is unclear whether implosions or microstreaming resulting from transient or stable cavitation respectively are responsible for micro-wounding. The micro-wounds created by sonication covered the surface of the treated tissue and ranged in size from less than  $1\text{ }\mu\text{m}$  up to  $1\text{ mm}$  with longer duration treatments. The holes in the surface of the plant material are clearly large enough for *Agrobacterium* to invade the wounded cells or tissues (Fig. 2D). Sonication of the plant tissue with *Agrobacterium*, as opposed to sonication of tissue before the application of *Agrobacterium*, did not alter transient expression levels (data not shown). Here, for ease of handling, sonication was always performed with *Agrobacterium*.

Histological analysis of SAAT-treated tissues revealed a large degree of bacterial colonization of both epidermal and subepidermal cells (Fig. 3). Without SAAT, bacteria were observed only on the surface of the cotyledons (Fig. 3A). In some SAAT-treated tissues, epidermal cells were heavily colonized, with large numbers of bacteria present in the majority of cells (Fig. 3B). Large numbers of bacteria were also observed in subepidermal cells (Fig. 3C), with bacteria penetrating up to 7–8 cells layers in some cases (data not shown). Some of the colonized subepidermal cells were either surrounded by or adjacent to apparently intact cells, indicating that SAAT allows very localized, deep micro-wounding without damage to the neighbouring cells. These deeper wounds are

Table 1. Transient expression of GUS with and without SAAT in various plant tissues.

Plant/tissue type	SAAT Duration (s) <sup>b</sup>	GUS expression <sup>c</sup>	
		–SAAT	+SAAT
soybean/immature cotyledons (–AS) <sup>a</sup>	2	0.05% $\pm$ 0.16	18.6% $\pm$ 14.4
soybean/immature cotyledons (+AS) <sup>a</sup>	2	0.44% $\pm$ 0.72	44.0% $\pm$ 21.3
cowpea/leaflets	60	0.5%	42%
wheat/seedlings	100	0 foci	28 foci
maize/immature embryos	30	0.6% $\pm$ 0.06	80.3% $\pm$ 8.3
white spruce/seedlings	50	0 foci	26 foci
soybean/embryogenic suspension	60	0 foci	1807 foci
buckeye/embryogenic suspension	20	0 foci	112 foci

<sup>a</sup>co-cultivated without (–) and with (+) acetosyringone (AS)

<sup>b</sup>conditions are representative and are not fully optimized

<sup>c</sup>Percentage values represent the proportion of surface area expressing GUS; foci is a count of GUS-positive foci; each value  $\pm$  standard deviation represents the mean of 10–30 replications.



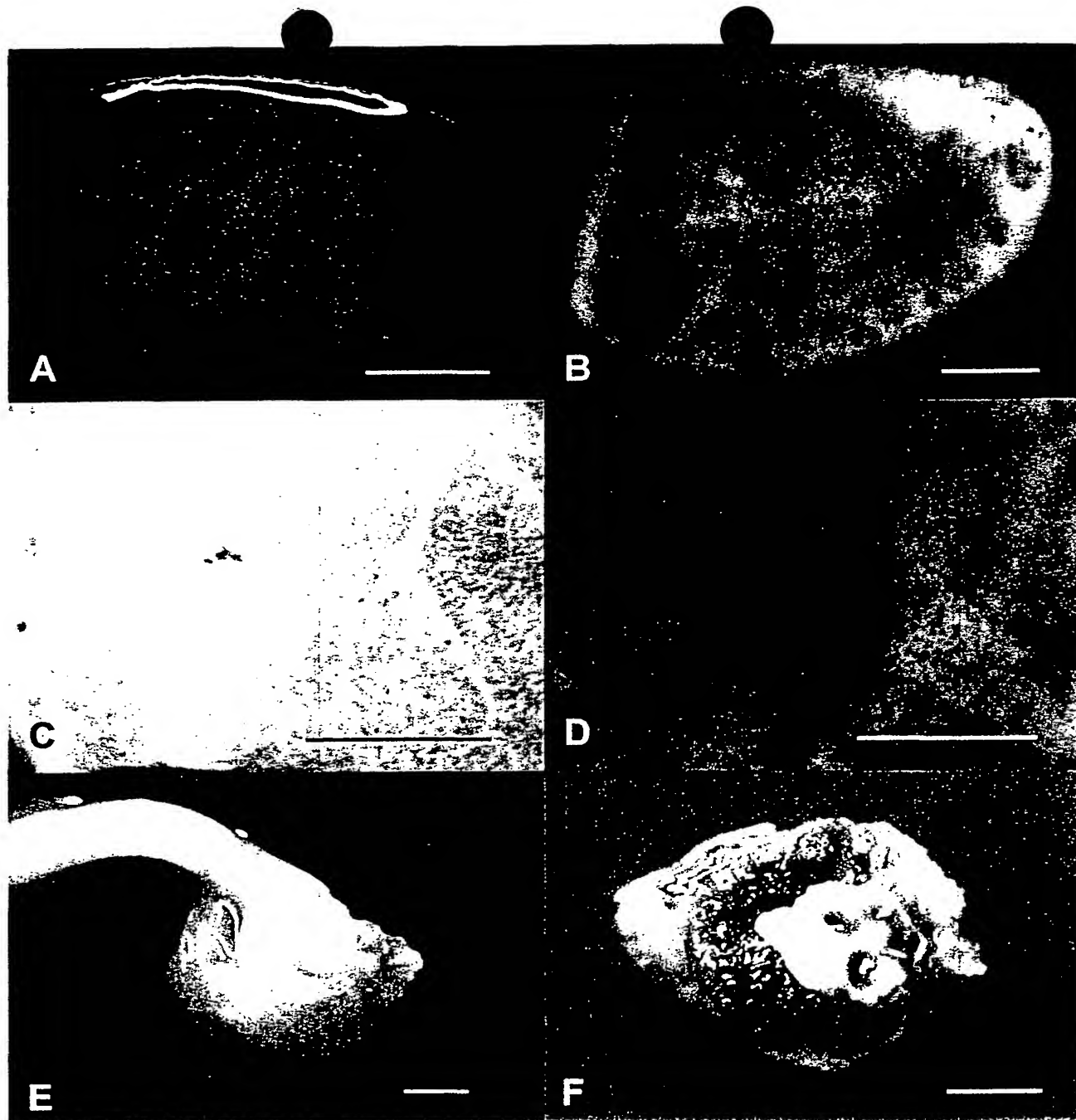


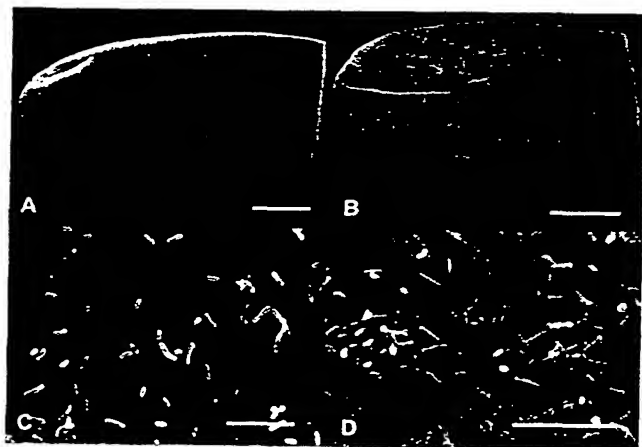
Fig. 1. Transient GUS expression in immature soybean cotyledons, cowpea leaves and immature maize embryos with and without SAAT. A. Soybean with *Agrobacterium* alone (bar = 1 mm). B. Soybean with SAAT (bar = 1 mm). C. Cowpea with *Agrobacterium* alone (bar = 500  $\mu$ m). D. Cowpea with SAAT (bar = 500  $\mu$ m). E. Maize with *Agrobacterium* alone (bar = 1 mm). F. Maize with SAAT (bar = 1 mm).



**Table 2.** Time course of SAAT on transient expression in immature cotyledons of soybean

SAAT Duration (s)	Surface area expressing GUS (%) <sup>a</sup>
0	0.6 ± 1.8
0.2	24.2 ± 22.6
1.0	48 ± 23
2.0	67 ± 35
5.0	62 ± 23
10.0	79.9 ± 9

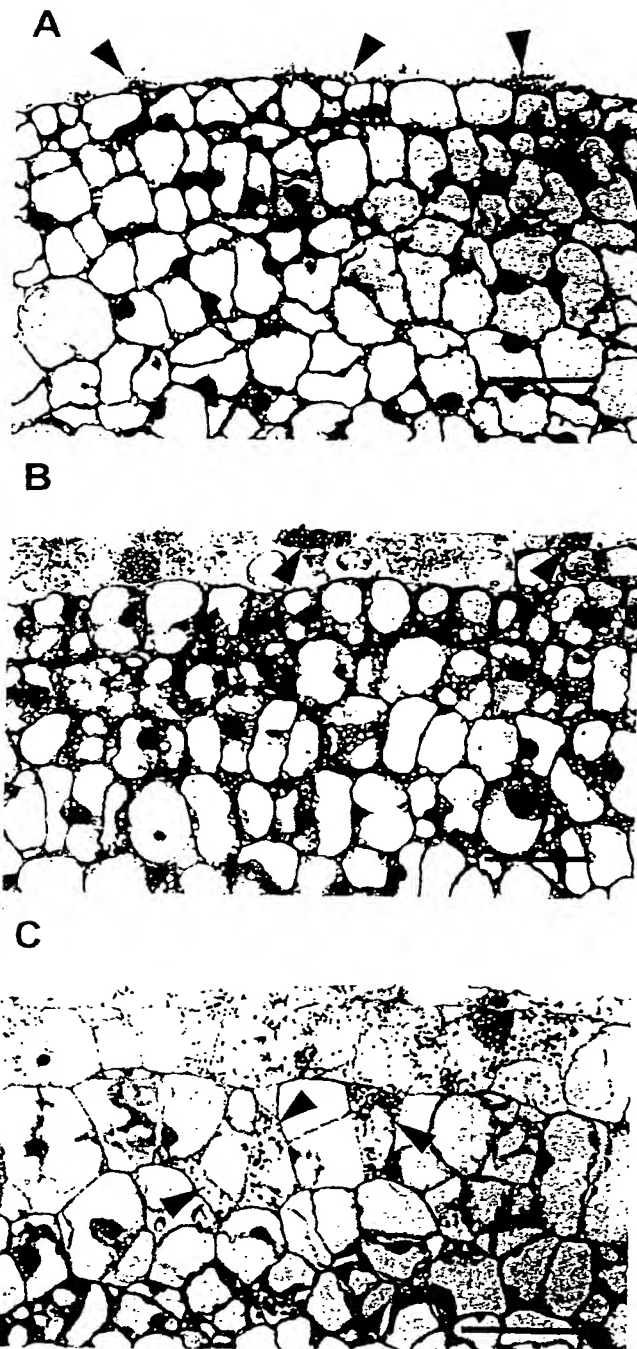
<sup>a</sup>Each value ± standard deviation represents the mean of 10–30 replications.



**Fig. 2.** Scanning electron micrographs of non-sonicated immature soybean cotyledons (A and C) and 5 s SAAT-treated samples with thousands of micro-wounds caused by sonication (B and D). A and B, bar = 500 µm; C and D, bar = 5 µm.

advantageous when subsurface targets such as cotyledonary nodes and shoot meristems are the targets for transformation. The presence of large numbers of colonized cells, adjacent to intact, apparently healthy cells, suggests that the surrounding intact cells are transformed by *Agrobacterium* from the inside of the neighbouring colonized cells. The large degree of GUS coloration within SAAT-treated tissue also indicates that large numbers of cells (those cells adjacent to colonized cells) are transiently transformed as a result of this process (Fig. 1). Because both large blue areas and small blue foci were observed together in most tissues (Fig. 1B, 1D), it is unlikely that extensive diffusion of GUS is responsible for these large GUS-positive regions. The large numbers of bacteria that were observed in many of the plant cells probably arose from introduction of one or a few bacteria into wounded cells which proliferated to give rise to the hundreds of bacteria present in these cells.

The efficiency of SAAT may be even further increased



**Fig. 3.** Cross section of control (A) and SAAT-treated (B and C) immature soybean cotyledons. Bacteria are indicated by the arrows. The epidermal cells of the non SAAT-treated tissues (A) are structurally intact and bacteria can be seen on the surface. In SAAT-treated samples, bacteria were clearly evident in epidermal cells (B) and also deeper within the tissue (C) indicating wounding of both surface and subsurface tissue. Bar = 50 µm.



by vacuum infiltration (Bechtold *et al.*, 1993) or another method that enhances the infection process. The use of AS during co-cultivation of SAAT-treated cotyledons did increase transient expression twofold (Table 1). In addition to the practical use of SAAT to enhance transformation rates in recalcitrant plants, the efficiency of *Agrobacterium* delivery may help to elucidate factors involved in the infection and transformation processes.

Stable transformation of soybean and buckeye embryogenic suspension cultures was obtained with SAAT. Although 23 stably transformed buckeye clones were recovered without the use of SAAT, no transgenic soybean clones were recovered unless SAAT was utilized. A total of 121 soybean and 348 buckeye clones that were both hygromycin-resistant and GUS-positive were recovered from our SAAT treatments. In addition, a few putative buckeye clones were recovered which did not express GUS. It was unclear whether these GUS-negative clones were escapes or simply did not express GUS, as molecular analysis of these tissues was not pursued. However, southern hybridization analysis of 5 soybean and 12 buckeye clones that were hygromycin-resistant and GUS-positive did confirm that these clones contained the hygromycin resistance gene (data not shown).

Further analysis of a few representative soybean and buckeye clones indicated DNA integration into either one or two sites (Fig. 4). For this analysis, genomic DNA from transgenic plant tissue was digested with *Hind*III and then probed with the coding region for the hygromycin resistance gene. *Hind*III recognizes two sites within Vec035; one inside the left border and the other between the GUS gene and the hygromycin resistance gene. Therefore, digestion of DNA with *Hind*III releases the intact GUS gene and the hygromycin resistance gene along with the right border and some plant DNA (depending on the location of *Hind*III-recognition sites in the plant DNA). Hybridization of *Hind*III-digested plant DNA with the coding region for hygromycin resistance should yield various sized hybridization signals showing the different integration events. Analysis of soybean and buckeye SAAT clones showed hybridization signals indicative of low copy independent transformation events (Fig. 4). This low copy number of introduced DNA in transgenic tissue is typical of *Agrobacterium*-mediated transformation. Hybridization of undigested plant DNA with the coding region for hygromycin resistance shows a hybridization signal above 23 kb, indicating integration of the T-DNA into high molecular weight plant DNA. While transgenic Ohio buckeye plantlets remain *in vitro*, transgenic soybean plants were successfully transplanted to soil and grown in the greenhouse. Unfortunately, both transformed and non-transformed plants (from the same starting culture) were fully sterile and progeny were not recovered. Loss of fertility of plants regenerated from long-term embryo-

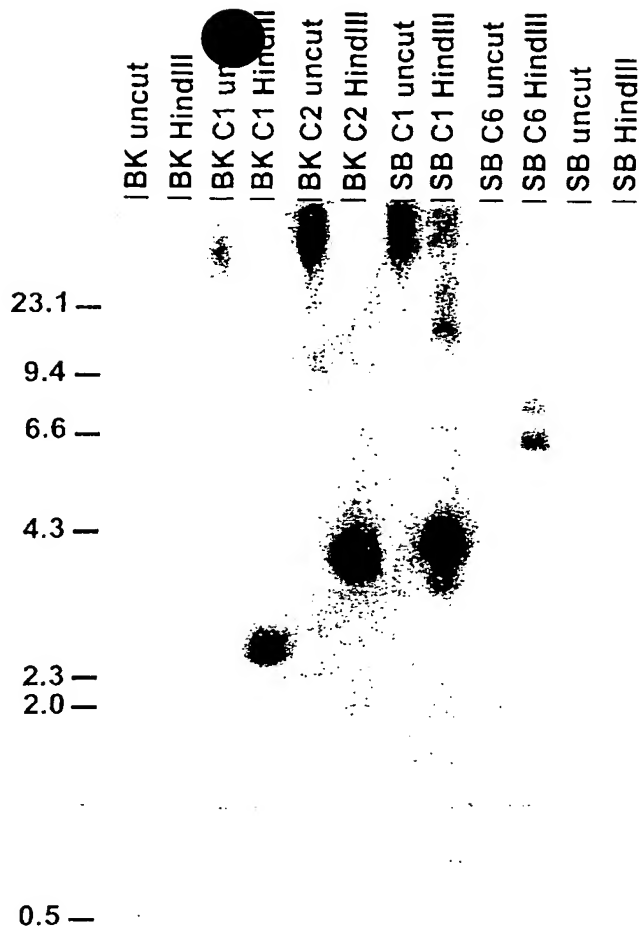


Fig. 4. Southern hybridization analysis of DNA from stably-transformed soybean and buckeye clones. Genomic DNA was digested with *Hind*III, which recognizes two sites within Vec035; one inside the left border and the other between the GUS and hygromycin resistance genes. The membrane was hybridized with the coding region for the hygromycin resistance gene.

genic suspension cultures of soybean has been previously reported (Iladi *et al.*, 1996). SAAT is currently being further evaluated on soybean as well as other plants and plant material for production of stably-transformed fertile plants.

SAAT permits the efficient delivery of *Agrobacterium* to large numbers of plant cells in a variety of different plant tissues. Using SAAT, *Agrobacterium*-plant interactions can be studied in great detail as bacterial





inoculations are consistent and controlled. This new method holds much promise for increasing transformation rates in all plants, especially those that are typically more recalcitrant to *Agrobacterium*-mediated transformation.

### Acknowledgements

We like to thank T. Hall and D. Frisch for providing Vec035 and B. Hood for supplying *Agrobacterium* EHA105. We gratefully acknowledge B. Norris, L. Ringley and J. Essig for technical assistance and E. Santarem, G. Collins, and W. Parrott for helpful discussion during the course of this research. Salaries and research support were provided by State and Federal funds appropriated to OSU/OARDC and by the United Soybean Board. Mention of trademark or proprietary products does not constitute a guarantee or warranty of the product by OSU/OARDC and also does not imply approval to the exclusion of other products that may also be suitable. Journal Article No. 159-96.

### References

- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993) In *planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences* 316, 1194-9.
- Becker, D. (1990) Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. *Nucl. Acid Res.* 18, 203.
- Bidney, D., Seelange, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L. and Huffman, G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 18, 301-13.
- Chee, P.P., Fober, K.A. and Slightom, J.L. (1989) Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 91, 1212-8.
- Finer, J.J. and McMullen, M.D. (1991) Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell and Develop. Biol. - Plant* 27P, 175-82.
- Finer, J.J. and Nagasawa, A. (1988) Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 15, 125-36.
- Finer, J.J., Finer, K.R. and Santarem, E.R. (1996) Plant cell transformation, physical methods for. In Meyers, R.A. ed., *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*, Weinheim, Germany: VCH Publishers, pp. 458-65.
- Frizzel, L.A. (1988) Biological effects of acoustical cavitation. In Suslick, K. ed. *Ultrasound, its Chemical, Physical, and Biological Effects* Weinheim, Germany: VCH Publishers, pp. 287-303.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-8.
- Hadi, M.Z., McMullen, M.D. and Finer, J.J. (1996) Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Reports* 15, 500-5.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6, 271-82.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2, 208-18.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eicholtz, D., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-31.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 14, 745-50.
- Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387-405.
- Joersbo, M. and Brunstedt, J. (1990). Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication. *Plant Cell Rep.* 9, 207-10.
- Joersbo, M. and Brunstedt, J. (1992) Sonication: A new method for gene transfer to plants. *Physiol. Plant.* 85, 230-4.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-97.
- Perl, A., Lotan, O., Abu-Abied, M. and Holland, D. (1996) Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nature Biotechnol.* 14, 624-8.
- Saghai-Marouf, M.A., Saliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Wallard, R. (1984) Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance; chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81, 8014-8.
- Santarem, E.R., Pelissier, B. and Finer, J.J. (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 33, 13-19.
- Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M. and Zambryski, P. (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells which activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318, 624-9.
- Suslick, K. (1988) Homogenous sonochemistry. In Suslick, K. ed., *Ultrasound, its Chemical, Physical, and Biological Effects* Weinheim, Germany: VCH Publishers, pp. 123-61.
- Tinland, B. and Hohn, B. (1995) Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. In Setlow, J.K. ed., *Genetic Engineering* Vol. 17, New York USA: Plenum Press, pp. 209-29.
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. and Rocha-Sosa, M. (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220, 245-50.
- Zhang, L., Cheng, L., Xu, N., Zhao, N., Li, C., Yuan, J. and Jia, S. (1991) Efficient transformation of tobacco by ultrasonication. *Bio/Technology* 9, 996-7.



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 2 月 14 日 (14.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/12521 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/84, 5/14, A01H 1/00, 5/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05214

(22) 国際出願日: 2000 年 8 月 3 日 (03.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 樋江井祐弘 (HIEI, Yukoh) [JP/JP]; 笠岡啓介 (KASAOKA, Keisuke) [JP/JP]; 石田祐二 (ISHIDA, Yuji) [JP/JP]; 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 谷川英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF IMPROVING GENE TRANSFER EFFICIENCY INTO PLANT CELLS

(54) 発明の名称: 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法

(57) Abstract: A method of improving the gene transfer efficiency into plant cells whereby a gene can be conveniently transferred without damaging tissues at a higher efficiency than in the conventional *Agrobacterium* gene transfer method. In this method, plant cells or plant tissues are heated and centrifuged to thereby improve the gene transfer efficiency into the plant cells mediated by a bacterium belonging to the genus *Agrobacterium*.

(57) 要約:

従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が開示されている。本発明の方法では、植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することを伴うことにより、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる。



WO 02/12521 A1



## 明細書

### 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法

#### 技術分野

本発明は、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法に関する。

5

#### 背景技術

アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が高い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNA という特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れた特徴を持っている。このため、さまざまな植物種で最も有用な形質転換の手段として広く用いられている。

10

このように、アグロバクテリウム法は非常に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成否ならびに効率は、植物種、遺伝子型ならびに用いる植物組織に依存して大きく異なるのが実状である (Potrykus et al. 1998 (参考文献 (36)))。すなわち、形質転換に成功していない植物種があるほか、ごく一部の品種のみ形質転換が可能な植物種も多い。また、利用可能な組織が限定されており大量の材料を取り扱うことができない植物種もある。遺伝子組換えにより実用的な品種を作出するには、多数の形質転換植物を作出した上で、目的とする形質を持った系統を選抜する必要がある。しかしながら、この目的に即し多数の形質転換体を容易に得ることができる作物の種類は、現状では一部に限定されている。したがって、このような問題点を解決することができる改良手法の開発が強く望まれている。

15

20

アグロバクテリウムを介する形質転換方法自体は、植物種により供試材料や培養に用いる培地の組成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバクテリウムの懸濁液を接触させ、共存培養の後に形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出するという操作ではほぼ共通している。材料となる植物組織には対しては、通常、必要に応じ滅菌処理を行うがそれ以外に特別な処理を施すことなくアグロバクテリウムの感染が行われる (Rogers et al. 1988 (参考文献 (37))), Vi

25

sser 1991 (参考文献 (41))), McCormick 1991 (参考文献 (31))), Lindsey et al. 19

91(参考文献(30)))。従って、形質転換系の改良は、アグロバクテリウムの菌系、ベクター構成、培地組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの種類、供試組織の種類などを中心に研究が行われてきた。

これに対し、アグロバクテリウムを接種する前の植物組織を、遺伝子導入が生じやすい生理的状态に変換するという考え方に基づく研究は、ほとんど行われていない。何らかの簡便な処理により、そのような生理的状态に変換することができればたいへん利用価値が高く、遺伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする顕著な効果も期待される。これまでの植物組織への前処理に関する研究例としては、パーティクルガン(Bidney et al., 1992(参考文献(6)))および超音波(Trick H.N. et al., 1997(参考文献(40)))処理が上げられる。どちらも物理的に組織を付傷することでバクテリアの植物組織内への侵入を促し、感染対象となる植物細胞を増加させることを目的としている。しかしながら、これは従来より広く行われているリーフディスク法(Horsch et al., 1985(参考文献(19)))を発展させたものに過ぎず、新規な考え方に基づく処理法ではない。なお、効果の程度や汎用性は明らかでなく、一般的な手法として用いられていないのが現状である。

#### 発明の開示

従って、本発明の目的は、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入方法において、遺伝子導入に供する植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することにより、遺伝子導入効率を有意に向上させることができることを見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供する。

本発明により、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い

効率で、組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供された。本発明の方法は、単子葉植物に対しても双子葉植物に対しても適用可能である。また、シバのように、従来のアグロバクテリウム法では形質転換することができなかった植物も、本発明の方法により形質転換が可能になった。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーバイナリーベクターの例であるpTOK233の構築方法を示す図である。

図2は、本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーバイナリーベクターの例であるpNB131の遺伝子地図を示す図である。

図3は、アグロバクテリウム属細菌の主要な2種類のベクターシステムである中間ベクターシステムとバイナリーベクターシステムの構築過程を示す模式図である。

図4は、アグロバクテリウム ツメファシエンスの強病原性菌株 A281 に由来する2種類のバイナリーベクターシステムを示す模式図である。

上記各図中、下記の符号は下記の意味を表す。

BL アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの左ボーダー配列

BR アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの右ボーダー配列

TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子

SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子

IG イントロンGUS遺伝子

HPT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子

NPT カナマイシン抵抗性遺伝子

K 制限酵素KpnI 部位

H 制限酵素HindIII 部位

Amp<sup>r</sup> アンピシリン耐性遺伝子

BAR bar遺伝子

COS, cos ラムダファージのCOS部位

ORI, ori ColE1の複製開始点

P35S CaMV 35Sプロモーター

Tnos ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター

5      virB Agrobacterium tumefaciens A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のウイルス領域中のvirB遺伝子

        virC Agrobacterium tumefaciens A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のウイルス領域中のvirC遺伝子

        virG Agrobacterium tumefaciens A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のウイルス領域中のvirG遺伝子

10      Vir アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドの全vir領域

        S Vir 強病原性アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドpTiBo542の全vir領域

        s vir\* TiプラスミドpTiBo542のvir領域の一部を含む断片

#### 発明を実施するための最良の形態

15      本発明の方法では、アグロバクテリウム属細菌を介した遺伝子導入方法において、遺伝子を導入する植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することを伴う。植物細胞又は植物組織は、熱処理及び遠心処理した後、常温及び通常の重力下でアグロバクテリウム属細菌と接触させてもよいし、熱処理及び／又は遠心処理しながらアグロバクテリウム属細菌と接触させてもよい。また、アグロバクテ

20      リウム属細菌と接触させる前に熱処理及び遠心処理を行う場合、これらの処理は同時に行ってもよいし、いずれかの処理を先に行った後にもう一方の処理を行ってもよい。

        熱処理条件は、用いる植物の種類や熱処理する細胞又は組織の量等に応じて適宜選択されるが、通常、30℃～60℃、好ましくは33℃～55℃、さらに好ましくは37℃～52℃程度の温度範囲で行われる。また、熱処理の時間は、熱

25      処理温度、用いる植物の種類及び熱処理する細胞又は組織の種類等に応じて適宜選択されるが、通常5秒間～24時間程度である。なお、熱処理時間は、熱処理温度が高い場合には短くても遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。



例えば、熱処理温度が60℃の場合には5秒間程度の熱処理時間でも遺伝子導入効率を有意に向上させることができる場合がある。一方、熱処理温度が34℃程度の低温の場合には、数十時間の熱処理により遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。特に好ましい熱処理条件は、37℃～52℃で1分間～24時間程度の場合が多いが、その植物細胞又は植物組織にとっての適切な熱処理条件は、ルーチンな実験により容易に設定することができる。なお、植物細胞又は植物組織を55℃以上の温度で長時間にわたって熱処理すると、植物細胞がダメージを受け、形質転換効率が低下する場合があるので、熱処理温度が55℃以上の場合には、熱処理時間を短くし、例えば3分間以下、好ましくは1分間以下程度に設定して植物細胞がダメージを受けないようにすることが好ましい。

遠心処理条件は、用いる植物の種類等に応じて適宜選択されるが、通常、100G～25万G、好ましくは500G～20万G、さらに好ましくは1000G～15万G程度の遠心加速度範囲で行われる。また、遠心処理の時間は、遠心加速度及び用いる植物の種類等に応じて適宜選択されるが、通常1秒間以上行うことが好ましい。なお、遠心時間の上限は特にはないが、通常、10分間程度で目的を達成することができる。なお、遠心処理時間は、遠心加速度が大きい場合には極めて短い時間、例えば1秒以下でも遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。一方、遠心加速度が小さい場合には、遠心処理を長く行うことにより遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。特に好ましい遠心処理条件は、500G～20万G、特には1000G～150000Gで1秒間～2時間程度の場合が多いが、その植物細胞又は植物組織にとっての適切な遠心処理条件は、ルーチンな実験により容易に設定することができる。

本発明の方法は、アグロバクテリウム属細菌と接触させる植物細胞又は植物組織として熱処理及び遠心処理したものを用いる、又は熱処理、遠心処理を行いながらアグロバクテリウム属細菌と接触させることを特徴とするものであり、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入あるいは形質転換方法自体としては、周知の方法をそのまま適用することができる。

アグロバクテリウム属細菌を用いた植物への遺伝子導入あるいは形質転換方法

自体は、この分野において周知であり、広く用いられている。

土壌細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) が多くの双子葉植物に根頭癌腫病 (crown gall disease) を引き起こすことは古くから知られており、1970 年代には、Ti プラスミドが病原性に関与すること、さらに Ti プラスミドの一部である T-DNA が植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後この T-DNA には癌腫の誘発に必要なホルモン (サイトカイニンとオーキシシン) の合成に関与する遺伝子が存在し、細菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNA の切り出しと植物への伝達には Ti プラスミド上のヴィルレンス領域 (vir 領域) に存在する遺伝子群が必要であり、また T-DNA が切り出されるためには T-DNA の両端に存在するボーダー配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌である *Agrobacterium rhizogenes* も Ri プラスミドによる同様なシステムを有している (図 3 及び図 4)。

アグロバクテリウムの感染によって T-DNA が植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNA 上に所望の遺伝子を挿入するとこの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれることが期待された。しかしながら、Ti プラスミドは 190kb 以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法ではプラスミド上の T-DNA 上に遺伝子を挿入することは困難であった。そのため、T-DNA 上に外来遺伝子を挿入するための方法が開発された。

まず、腫瘍性の Ti プラスミドの T-DNA からホルモン合成遺伝子が除去されたディスアーム型の菌系 (disarmed strains) である LBA4404 (Hoekema et al., 1983 (参考文献 (14))), C58C1 (pGV3850) (Zambryski et al., 1983 (参考文献 (44))), GV3Ti11SE (Fraley et al., 1985 (参考文献 (10))) などが作製された (図 3)。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムの Ti プラスミドの T-DNA 中に、あるいは所望の遺伝子を有する T-DNA をアグロバクテリウムに導入する 2 種類の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大腸菌で複製ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのディスアーム型 Ti プラスミドの T-DNA 領域中に、三系交雑法 (triparental mating) (Ditta et al., 1980 (参考文献 (9))) を介して相同組換えに

より導入する方法であり、中間ベクター法と呼ばれる (Fraley et al., 1985 (参考文献(10))); Fraley et al., 1983 (参考文献(11))); Zambryski et al., 1983 (参考文献(44))、特開昭 59-140885 号 (EP116718) )。もう一つは、バイナリーベクター (binary vector) 法とよばれるもので (図 3)、T-DNA の植物への組み込みには vir 領域が必要であるが、機能するために同じプラスミド上に存在する必要はないという結果 (Hoekema et al., 1983 (参考文献(14))) に基づいている。この vir 領域には virA、virB、virC、virD、virE 及び virG が存在し、(植物バイオテクノロジー事典 (エンタプライズ株式会社発行 (1989) ) )、vir 領域とはこの virA、virB、virC、virD、virE 及び virG の全てを含むものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DNA をアグロバクテリウムと大腸菌の両方で複製可能な小さなプラスミドに組み込んだものであり、これをディスアーム型 Ti プラスミドを有するアグロバクテリウムに導入して用いる。アグロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの方法により行うことができる。バイナリーベクターには、pBIN19 (Bevan, 1984 (参考文献(5)))、pBI121 (Jefferson, 1987 (参考文献(21)))、pGA482 (An et al., 1988 (参考文献(2)))、特開昭 60-70080 号 (EP120516) ) などがあり、これらをもとに数多くの新たなバイナリーベクターが構築され、形質転換に用いられている。また、Ri プラスミドのシステムにおいても、同様なベクターが構築され形質転換に用いられている。

アグロバクテリウム A281 (Watson et al., 1975 (参考文献(42))) は、強病原性 (super-virulent) の菌系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他の菌系より高い (Hood et al., 1987 (参考文献(15))); Komari, 1989 (参考文献(23)))。この特性は、A281 が有する Ti プラスミドの pTiBo542 によるものである (Hood et al., 1984 (参考文献(18))); Jin et al., 1987 (参考文献(22))); Komari et al., 1986 (参考文献(26)))。

pTiBo542 を用いて、これまでに 2 つの新しいシステムが開発されている。一つは pTiBo542 のディスアーム型の Ti プラスミドを有する菌系 EHA101 (Hood et al., 1986 (参考文献(17))) および EHA105 (Hood et al., 1993 (参考文献(16))) を

用いたものであり、これらを上述のバイナリーベクターシステムに適用することにより、形質転換能力の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。もう一つは、スーパーバイナリーベクター ('super-binary' vector) (Hiei et al., 1994(参考文献(13)); Ishida et al., 1996(参考文献(20)); Komari et al., 1999(参考文献(28))、W094/00977 号、W095/06722 号)システムである (図4)。このシステムは、*vir* 領域 (*virA*、*virB*、*virC*、*virD*、*virE* 及び *virG* (以下、これらをそれぞれ「*vir* 断片領域」ということもある。)) を持つディスアーム型の Ti プラスミドおよび T-DNA を有するプラスミドからなることから、バイナリーベクターシステムの一つである。しかしながら、T-DNA を有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターに *vir* 断片領域のうち、少なくとも一つの *vir* 断片領域を実質的に取除いた *vir* 領域の断片 (このうち好ましくは少なくとも *virB* 又は *virG* を含む断片、さらに好ましくは *virB* 及び *virG* を含む断片) を組み込んだ (Komari, 1990a(参考文献(24))) スーパーバイナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだ T-DNA 領域を導入するには、三系交雑法を介した相同組換えが容易な手法として利用できる (Komari et al., 1996(参考文献(27)))。このスーパーバイナリーベクターシステムは、上述の種々のベクターシステムと比べて、多くの植物種で非常に高い形質転換効率をもたらすことが明らかとなっている (Hiei et al., 1994(参考文献(13)); Ishida et al., 1996(参考文献(20)); Komari, 1990b(参考文献(25)); Li et al., 1996(参考文献(29)); Saito et al., 1992(参考文献(38)))。

本発明の方法においては、宿主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、*Agrobacterium tumefaciens* (例えば上述の *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema et al., 1983(参考文献(14))) および EHA101 (Hod et al., 1986(参考文献(17))) を好ましく用いることができる。

本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細菌における病原性 (*vir*) 領域の遺伝子群の発現に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることなく有意な効果を得ることができる。したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベ

クター、強病原性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなどいずれのベクターシステムに対しても用いることができ、本発明による効果を得ることができる。これらのベクター類を改変した異なるベクターシステムを用いた場合においても同様である（例えば、アグロバクテリウム属細菌の *vir* 領域の一部または全部を切り出し付加的にプラスミド中に組み込む、*vir* 領域の一部または全部を切り出し新たなプラスミドの一部としてアグロバクテリウムに導入するなど）。また、当然ではあるが本発明の方法によれば、野生型のアグロバクテリウム属細菌においても、植物へ野生型の T-DNA 領域の導入効率を高め、事実上感染効率を向上することができる。

植物に導入しようとする所望の遺伝子は、上記プラスミドの T-DNA 領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、当該プラスミドに同時に若しくは別途組込んだカナマイシン、パロモマイシン等の薬剤に対する耐性を有する遺伝子等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。大型で多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望の DNA を T-DNA 領域内に導入することが必ずしも容易でないことがある。このような場合には、三系交雑法により、アグロバクテリウム属細菌の細胞内での相同組換えを利用することで目的の DNA を導入することができる。

また、プラスミドを *Agrobacterium tumefaciens* 等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例としては、上記した三系交雑法やエレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEG などの化学的な処理による方法などが含まれる。

植物に導入しようとする遺伝子は、従来技術と同様に基本的には T-DNA の左右境界配列の間に配置されるものである。しかし、プラスミドが環状であるため、境界配列の数は 1 つでもよく、複数の遺伝子を異なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が 3 個以上あってもよい。また、アグロバクテリウム属細菌中で、Ti または Ri プラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミド上に配置されてもよい。さらには、複数の種類のプラスミド上に配置されてもよい。

アグロバクテリウム属細菌を介して遺伝子導入を行う方法は、植物細胞又は植

物組織をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^6 \sim 10^{11}$  細胞/ml 程度の細胞濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に植物細胞又は植物組織を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。

- 5 遺伝子導入に供される細胞又は組織は、何ら限定されるものではなく、葉、根、茎、実、その他いずれの部位であってもよいし、カルスのような脱分化したものでも脱分化していない胚等であってもよい。また、植物の種類も何ら限定されな

- 10 下記実施例において具体的に示されるように、本発明の方法によれば、従来のアグロバクテリウム法に比較して、遺伝子導入の効率が有意に向上する。また、従来からアグロバクテリウム法により遺伝子導入が可能であった植物の遺伝子導入効率が向上するだけでなく、従来のアグロバクテリウム法によっては遺伝子導入することができなかつた植物に対しても本発明の方法により遺伝子導入が初
- 15 めて可能になった。従って、本発明における「遺伝子導入の効率の向上」には、従来の方法では遺伝子導入が不可能であったものを可能にすることも包含される（すなわち、従来0%であった遺伝子導入効率を向上させたと考える）。

### 実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 20 実施例 1

##### (1) 供試組織および供試菌系

- 25 ジャポニカイネの朝の光を供試品種とし、未熟胚を材料として用いた。供試未熟胚は、開花後1～2週間の未熟種子から採取し、Hiei, Y., et al. (参考文献(13))の方法により調製した。すなわち、開花後、7～12日目の未熟種子を頤を除去した後、70% エタノールに30秒、1%次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬することにより消毒した後、未熟胚を取り出し供試材料とした。また、未熟胚由来カルスは、未熟胚を4g/l Gelrite を含む2N6培地 (Hiei et al. 1994(参考文献(13))、(N6の無機塩およびビタミン類 (Chu C. C. 1978(参考文献(

8))、1 g/l カザミノ酸、2 mg/l 2, 4-D) ) 上で2週間培養することにより得た。

アグロバクテリウムの菌系及びプラスミドベクターとして、LBA4404(pIG121Hm) (Hiei et al., 1994(参考文献(13)))、LBA4404(pNB131) (図2参照)、LBA4404(pTOK233) (Hiei et al., 1994(参考文献(13)))を用いた。

pNB131の構築は、以下のように行った。pSB31(Ishida Y, 1996(参考文献(20)))を大腸菌LE392株に導入した後、Triparental mating法(Ditta G, 1980(参考文献(9)))により、pNB1(Komari T et al., 1996(参考文献(27)))を有するアグロバクテリウムLBA4404株に導入した。アグロバクテリウム内でpNB1とpSB31の間の相同組換えによりpNB131を得た。

pIG121HmのT-DNA領域には、ノパリン合成酵素(nos)遺伝子のプロモーターにより制御されるカナマイシン耐性(nptII)遺伝子、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターにより制御されるハイグロマイシン耐性(hpt)遺伝子、35Sプロモーターにより制御されヒマのカタラーゼ遺伝子のイントロンが介在するGUS遺伝子(Ohta, S. et al., 1990(参考文献(33)))を有する。

pNB131のT-DNA領域には、35Sプロモーターにより制御されるbar遺伝子、35Sプロモーターにより制御されイントロンが介在するGUS遺伝子(上述)を有する。

pTOK233のT-DNA領域には、nosプロモーターにより制御されるnptII遺伝子、35Sプロモーターにより制御されるhpt遺伝子、35Sプロモーターにより制御されイントロンが介在するGUS遺伝子(上述)を有する。pTOK233は形質転換能力が高いスーパーバイナリーベクター(Komari, T. et al., 1999(参考文献(28)))である。

## (2) 熱処理

供試組織5~200mgを2mlの滅菌水の入ったチューブに浸漬した。チューブを各処理温度に設定したウォーターバスに数秒~数十時間浸漬することにより熱処理を行った。熱処理終了後、チューブは流水で冷却した。

## (3) 遠心処理

供試組織を滅菌水の入った遠心用チューブに浸漬し、25℃、20,000Gで1分ないし60分の遠心処理を行った。

#### (4) 接種および共存培養

熱もしくは遠心処理、あるいは組合せて処理した後、チューブ内部の滅菌水を除き、アグロバクテリウムの懸濁液を加え、5～30秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。バクテリア懸濁液の調製はHiei, Y. et al., (参考文献(13))によった。すなわち、AB培地 (Chilton, M-D., et al., 1974(参考文献(7))) 上で3～10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、修正AA培地 (AA主要無機塩類、AAアミノ酸及びAAビタミン類 (Toriyama K. et al., 1985(参考文献(39)))、MS微量塩類 (Murashige, T. et al., 1962(参考文献(32)))、1.0 g/l カザミノ酸、100  $\mu$ M アセトシリゴン、0.2 M ショ糖、0.2 M グルコース) に懸濁した。また、懸濁液の菌密度は、約  $0.3 \sim 1 \times 10^9$  cfu/ml に調整した。約5分間室温で静置した後、共存培養用の培地に置床した。共存培養の培地には、8g/l アガロースを培地固化剤とした2N6-AS (Hiei et al. 1994(参考文献(13))) を用いた。25℃、暗黒下で3～7日間共存培養した後、未熟胚の一部を、Hiei ら (1994) (参考文献(13))の方法によりX-Gluc 処理によるGUS遺伝子の発現調査に供した。すなわち、共存培養処理直後、組織を0.1% Triton X-100 を含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.8) に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを除去した後、1.0 mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロン酸 (X-gluc) および20% メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、青色の呈色を示す組織を顕微鏡下で観察した。

#### (5) 形質転換細胞の選抜 (ジャポニカイネ)

共存培養後、肥大生長した未熟胚の胚盤部位をメスにより4～7分割した後、選抜薬剤を含まない2N6培地 (上述) で数日間30℃明条件下で培養した。次に、50～100 mg/l ハイグロマイシンを含む2N6培地上に移植し、30℃明条件下で約2～3週間培養した。なお、10mg/l フォスフィノスリシン (PPT) を選抜薬剤に含む培



地には、2 mg/l の 2,4-D を含みココナッツ水を除いた GC 培地 (Potrykus et al. 1979 (参考文献 (34))) を用いた。培地上に形成された薬剤耐性カルスを、それぞれ同濃度の選抜薬剤を含む N6-7 培地 (Hiei et al. 1994 (参考文献 (13))) に移植し、7 日間 30°C 明条件下で 2 次選抜を行った。各培地には 250 mg/l セフトキシムと 250 mg/l カルベニシリン二ナトリウムを組み合わせ、もしくは 250 mg/l セフトキシムを単独で添加した。また培地固化剤には、4g/l Gelrit を用いた。培地上で増殖した薬剤耐性カルスに X-Gluc 処理を行い、上記の方法により GUS 遺伝子の発現を調査した。

#### (6) 結果

熱および遠心を組合せおよび単独で未熟胚に処理し、LBA4404 (pIG121Hm) および LBA4404 (pNB131) との共存培養した後の GUS 遺伝子の一過性発現の結果を表 1 および表 2 に示した。無処理区に比べ、熱処理もしくは遠心処理を行った場合に、胚盤における GUS 発現領域は明らかに広く、より高頻度で遺伝子導入が生じていた。さらに、熱と遠心処理を組み合わせることにより、その頻度がさらに高くなった。

イネ未熟胚とアグロバクテリウムを共存培養した後、選抜薬剤を含む培地上で培養して得られた形質転換カルスの選抜結果を表-3、表-4 および表-5 に示した。薬剤耐性かつ一様な GUS 遺伝子の発現を示す形質転換カルスが得られる効率は、いずれの試験においても、熱または遠心処理を行うことにより、顕著に向上した。また、熱および遠心処理を組み合わせることで、それぞれの単独処理よりもさらに形質転換効率が向上した (表 3、表 4、表 5)。以上のように、イネ未熟胚へ熱および遠心処理を組合せて行うことにより、それぞれ単独の処理よりもさらに高い頻度で形質転換できることが明らかとなった。

また、品種の違いなどによって遠心処理単独で遺伝子導入の効果が低い場合には、熱処理を併用することによって遺伝子導入効率が顕著に向上し、その効果は熱処理単独区より高頻度となることも確認した。さらに、遠心処理時に遠心機の温度設定を 40°C 前後とすることで、遠心と熱の同時処理が可能であり、上記の組み合わせ処理と同様な効果があることを確認している。

Hiei et al. (1994) (参考文献(13)) は、イネのカルスを材料として比較的高い効率で形質転換が行うことができることを報告している。また、Aldemita R R et al., (参考文献(1)) は、イネの未熟胚を用いた形質転換例を報告している。これらの形質転換手法をより効率よく安定して実施するために、上述した組み合わせ処理法は非常に有効である。特に、未熟胚は栽培環境に左右されやすく形質転換に好適な未熟胚材料を常時得ることは容易ではないが、組み合わせ処理を施すことにより安定した高い形質転換効率を維持することが可能である。Hiei et al. (1994 (参考文献(13))) は、形質転換能力の高いベクターであるスーパーバイナリーベクターがイネの形質転換効率を向上させることを示した。また、Aldemita RR. et al., 1996 (参考文献(1)) によれば、スーパーバイナリーベクターの LBA4404 (pTOK233) を用いた試験においてのみ、形質転換体を得ている。本研究における組み合わせ処理法は、通常のバイナリーベクターを用いた場合においても、スーパーバイナリーベクターに匹敵するか、それ以上の遺伝子導入効率を得ることができる。また、スーパーバイナリーベクターと組み合わせ処理法を併用することにより、より一層効率を向上させることが可能である。さらに、組み合わせ処理法を用いることにより、これまで全く形質転換体を得ることができなかった品種においても形質転換体を得ることができるものと推察される。

表 1 熱・遠心処理と未熟胚胚盤における GUS 遺伝子の一過性発現 (品種：朝の光)

処理温度 (処理時間 )	遠心加速度 (処理時間)	供試 未熟 胚数	未熟胚数							
			胚盤表面における GUS 発現領域の割合 (%)							
			0	0-1	1-10	10-20	20-50	50-80	80-100	
-	-	20	3	8	8	1	0	0	0	
46℃ (5 分)	-	20	1	6	7	4	2	0	0	
-	20,000G (30 分)	20	0	1	4	7	7	1	0	
46℃ (5 分)	20,000G (30 分)	20	0	0	0	2	9	8	1	

供試菌系：LBA4404 (pIG121Hm), 共存培養期間：5 日

表 2 熱・遠心処理と未熟胚胚盤における GUS 遺伝子の一過性発現（品種：朝の光）

処理温度 (処理時間 )	遠心加速度 (処理時間)	供試 未熟 胚数	未熟胚数							
			胚盤表面における GUS 発現領域の割合 (%)							
			0	0-1	1-10	10-20	20-50	50-80	80-100	
-	-	20	3	13	4	0	0	0	0	
46℃ (5 分)	-	20	0	0	10	7	3	0	0	
-	20,000G (30 分)	20	0	0	3	9	8	0	0	
46℃ (5 分)	20,000G (30 分)	20	0	0	0	3	14	3	0	

供試菌系：LBA4404 (pNB131)，共存培養期間：6 日

表 3 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率（品種：朝の光）

処理温度 (処理時間)	遠心加速度 (処理時間)	供試未熟 胚切片数 (A)	Hm 耐性 GUS 陽性 カルス数 (B)	B/A (%)
-	-	50	6	12.0
46°C (5 分)	-	51	15	29.4
-	20,000G (30 分)	51	29	56.9
46°C (5 分)	20,000G (30 分)	46	29	63.0

5 供試菌系：LBA4404 (pIG121Hm)，共存培養期間：5 日，Hm：100mg/l ハイグロマイシン

表4 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率（品種：朝の光）

処理温度 (処理時間)	遠心加速度 (処理時間)	供試未熟胚切片 数 (A)	Hm 耐性 GUS 陽性 カルス数 (B)	B/A (%)
-	-	60	7	11.7
46°C (5 分)	-	60	9	15.0
-	20,000G (1 分)	60	48	80.0
-	)	60	48	80.0
46°C 5 分	20,000G (60 分)	60	51	85.0
46°C 5 分	)	60	51	85.0
	20,000G (1 分)			
	)			
	20,000G (60 分)			
	)			

供試菌系：LBA4404(pIG121Hm)，共存培養期間：6 日，Hm：100mg/l ハイグロマイシン

表5 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率（品種：朝の光）

処理温度 (処理時間)	遠心加速度 (処理時間)	供試未熟胚 切片数 (A)	PPT 耐性 GUS 陽 性 カルス数 (B)	B/A (%)
-	-	62	18	29.0
46°C (5 分)	-	64	32	52.5
-	20,000G (30 分)	60	39	65.0
46°C 5 分	20,000G (30 分)	60	41	68.3

5 供試菌系：LBA4404(pNB131)，共存培養期間：6 日，PPT：10mg/l フォスフィノスライシン

## 実施例2

大きさ約 1.2 mm のトウモロコシ未熟胚（品種 A188、農林水産省生物資源研究所より入手）を無菌的に取り出し、LS-inf 液体培地を含む 2 ml のチューブに入れた。同液体培地で一回洗浄した後、新たに同液体培地 2.0 ml を加えた。熱処理は 46°C のウォーターバスにチューブを 3 分間浸漬することにより行った。遠心処置は冷却遠心分離機により 20 KG、4°C で 30 分間遠心することにより行った。熱・遠心の組合せ処理は、上記熱処理後、上記遠心処理を行った。対照は、室温で同時間静置した。各処理をした後、培地を除き、100 μM のアセトシリンゴンを含む LS-inf 液体培地に約  $1 \times 10^9$  cfu/ml の濃度で、*Agrobacterium tumefaci*

ens LBA4404 (pSB131) (Ishida et al. 1996 (参考文献(20))) を懸濁した液 1.0 ml を加え、30 秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。5 分間室温で静置した後、胚軸面が培地に接するように 10  $\mu$  M  $\text{AgNO}_3$  を含む LS-AS 培地に置床した。25°C、暗黒下で 3 日間培養した後、一部の未熟胚を採取し、X-gluc により GUS 遺伝子のトランジェントな発現を調査した。なお、pSB131 はスーパーバイナリーベクターである。

共存培養後の未熟胚をフォスフィノスリシン (PPT) 及び 10  $\mu$  M  $\text{AgNO}_3$  を含む培地で培養し、形質転換細胞の選抜を行った。選抜培地上で増殖したカルスを PPT を含む再分化培地に置床し、形質転換植物の再分化を行った。再分化した植物の葉の一部を切り取り、実施例 1 と同様に X-gluc により GUS 遺伝子の発現を調査した。なお、上記の培地および培養法は、Ishida, Y. et al., 1996 (参考文献(20)) に記載の方法に従った。

各処理を行った未熟胚に LBA4404 (pSB131) を接種したときの GUS 遺伝子のトランジェントな発現の結果を表 6 に示す。無処理の対照を含め試験に供した全ての未熟胚で GUS 遺伝子の発現が認められた。しかし、その発現部位は対照に比べ熱処理及び熱・遠心の組合せ処理した場合に強く見られた。特に組合せ処理した場合には、未熟胚の胚盤表面の広い部位で GUS 遺伝子の発現を示すものが最も多く見られた。

LBA4404 (pSB131) を接種した未熟胚での形質転換結果を表 7 に示す。熱処理していない対照の未熟胚からは、10.7% の効率で形質転換植物が得られた。これに対し、20 KG、4°C、30 分間の遠心処理を行った未熟胚では、形質転換効率は 13.3% で、無処理に比べ、効率が向上した。熱処理を行った未熟胚での形質転換効率は 20% で、無処理の約 2 倍に効率が向上した。さらに、熱・遠心の組合せ処理を行った場合、形質転換効率は無処理の約 3 倍の 29.6% であった。

以上の結果から、材料の未熟胚を接種前に遠心処理あるいは熱処理することにより、従来法に比べ形質転換効率が向上するが、両処理を組み合わせることにより、さらに、高い効率で形質転換のなされることが明らかとなった。これらのことから、従来のアグロバクテリウム法では形質転換できなかった A188 以外のト

ウモロコシ品種 (Ishida et al. 1996(参考文献(20))) についても熱、遠心を組み合わせて処理することにより形質転換植物の得られる可能性が示唆された。

表6 各処理の遺伝子導入効率に及ぼす影響 (LBA4404 (pSB131) を接種)

処理	供試 未熟胚	G U S			
		+++	++	+	-
無処理	9	0	3	6	0
熱	9	1	7	1	0
遠心	12	0	3	9	0
熱・遠心	17	5	9	3	0

共存培養後の未熟胚での GUS 遺伝子のトランジェントな発現の結果

5 表7 各処理の形質転換効率に及ぼす影響 (LBA4404 (pSB131) を導入)

処理	供試 未熟胚数	PPT 耐性 カルス (%)	PPT 耐性 植物 (%)	GUS+ 植物 (%)
無処理	28	9 (32.1)	9 (32.1)	3 (10.7)
熱	30	18 (60.0)	15 (50.0)	6 (20.0)
遠心	30	14 (46.6)	9 (30.0)	4 (13.3)
熱・遠心	27	23 (85.2)	20 (74.1)	8 (29.6)

カルス数、植物数はいずれもクローンを含まない。

### 実施例 3

クリーピングベントグラス (*Agrostis palustris* cv. *Pencross*、雪印種苗 (株)) の完熟種子を滅菌後、MS 無機塩、MS ビタミン、4 mg/l dicamba、0.5 mg/l 6BA、0.7 g/l プロリン、0.5 g/l MES、20 g/l ショ糖、3 g/l gelrite (pH 5.8) を含む培地 (TG2 培地) に置床し、25°C、暗黒下で培養した。誘導されたカルスを同組成の培地で継代培養し、エンブリオジェニックなカルスを増殖した。得られたエンブリオジェニックなカルスを TG2 から gelrite を除いた組成の液体培地 (TG2L) に移し、25°C、暗黒下で振盪培養することにより、懸濁培養細胞を得た。継代後 3-4 日目の懸濁培養細胞を TG2L 培地を含む 2 ml のチューブに入れた。同液体培地で一回洗浄した後、新たに液体培地 2 ml を加えた。46°C のウォーターバスにチューブを 5 分間浸漬した。培地を除き、新たに同液体培地を加えた後、5,000 rpm、4°C、10 分間遠心処理した。対照は、室温で同時間静置した。培地を除き、100  $\mu$ M のアセトシリンゴンを含む TG2-inf 培地 (TG2 培地からプロリン、MES、gelrite を除き、48.46 g/l ショ糖、36.04 g/l グルコースを添加

(pH 5.2)) に約  $1 \times 10^9$  cfu/ml の濃度で、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pTOK233) (上述) を懸濁した液 1.0 ml を加え、30 秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。5 分間室温で静置した後、TG2L 培地に 10 g/l グルコース、100  $\mu$ M アセトシリンゴン、4 g/l タイプ I アガロース (pH5.8) を添加した培地 (TG2-AS 培地) に置床した。25°C、暗黒下で 3 日間培養した後、250 mg/l のセフトキシム及びカルベニシリンを含む TG2L 培地で細胞を 3 回洗浄した。同培地に懸濁し、25°C、暗黒下、70 rpm で回転振盪培養した。1 週間後、同培地に 50 mg/l のハイグロマイシンを含む培地で継代し、さらに 1 週間培養した後、一部の細胞を採取し X-gluc により GUS 遺伝子の発現を調査した。

LBA4404 (pTOK233) を接種したシバ懸濁培養細胞での GUS 遺伝子の発現を表 8 に示す。対照の細胞は、わずかに 1 細胞塊が GUS の発現を示したのみであった。これに対し、熱・遠心処理した場合、約 3 割の細胞塊が GUS 遺伝子の発現を示した。また、GUS 遺伝子の発現部位も対照の細胞塊に比べ、熱・遠心処理した細胞塊ではその部位は大きかった。

今までに報告されているシバの形質転換はパーティクルガン (Zhong et al. 1993 (参考文献 (45)), Hartman et al. 1994 (参考文献 (12)), Xiao, L. et al., 1997 (参考文献 (43))) やエレクトロポレーション (Asano Y., 1994 (参考文献 (3)), Asano Y. et al. 1998 (参考文献 (4))) による直接導入法によるもので、アグロバクテリウムによる形質転換の成功例はみられない。本実施例でもみられたように、従来法による遺伝子導入の効率の低さが、アグロバクテリウム法によるシバの形質転換を困難にしている原因であれば、高頻度で遺伝子導入のなされる本願発明の熱・遠心の組合せ処理により、形質転換植物の得られる可能性が示された。

表 8 シバ懸濁培養細胞への遺伝子導入効率に及ぼす熱・遠心処理の効果

処理	細胞塊数		
	総数	GUS+	GUS+ (%)
熱・遠心	79	23	29.1
対照	101	1	1.0

共存培養後、2 週間後に GUS 遺伝子の発現を調査

参考文献

- (1) Aldemita RR, Hodg s TK (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
- (2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1988) Binary vectors. In Gelvin, S.B. and Schilperoort, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A3*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.
- (3) Asano, Y., Ugaki, M. (1994) Transgenic plants of *Agrostis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Reports* 13:243-246.
- (4) Asano, Y., Ito, Y., Fukami, M., Sugiura, K., Fujiie, A. (1998) Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Reports* 17:963-967.
- (5) Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12, 8711-8721.
- (6) Bidney, D., Scelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L., and Huffmanm G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 18, 301-313.
- (7) Chilton, M-D., Currier, TC. Farrand, SK. Bendich, AJ. Gordon, MP. & Nester EW. (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:3672-3676
- (8) Chu, C. C., (1978) *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Science Press Peking, pp.43-50
- (9) Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R. (1980) Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7347-7351.
- (10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eicholtz, D.A. and Flick,



J.S. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transformation. *Bio/technology*, 3, 629-635.

(11) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 4803-4807.

(12) Hartman, G.L., Lee, L., Day, P.R., Tumer, N.E. (1994) Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. *Biotechnology* 12:919-923.

(13) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.

(14) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180.

(15) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1987) Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 on legumes. *Plant Physiol*, 83, 529-534.

(16) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.*, 2, 208-218.

(17) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.*, 168, 1291-1301.

(18) Hood, E.E., Johnson, G., Kaye, L., Kramarz, J., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1984) Restriction endonuclease map of pTiBo542, a potential Ti

-plasmid vector for genetic engineering of plants. *Bio/technology*, 2, 702-709.

(19) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.

(20) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.*, 14, 745-750.

(21) Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5, 387-405.

(22) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1987) Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *J. Bacteriol.*, 169, 4417-4425.

(23) Komari, T. (1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by *Agrobacterium*. *Plant Sci.*, 60, 223-229.

(24) Komari, T. (1990a) Genetic characterization of double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. *Theor. Appl. Genet.*, 80, 167-171.

(25) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Reports*, 9, 303-306.

(26) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (1986) Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTiBo542. *J. Bacteriol.*, 166, 88-94.

(27) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.*, 10, 165-174.

(28) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Genetic Transformation: Agrobacterium tumefaciens. In Vasil, I.K. (ed.) Molecular improvement of cereal crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43-82.

(29) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I. and Puonti-Kaerlas, J. (1996)  
5 Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Nature Biotechnol., 14, 736-740.

(30) Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarbeet by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manual B7:1-13. Kluwer Academic Publishers.

(31) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manual B6:1-9. Kluwer Academic Publishers.  
10 s.

(32) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) Physiol. Plant 15:473-497.

(33) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Namamura, K. (1990) Construction and expression in tobacco of a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. Plant Cell Physiol. 31: 805-8  
15 13.

(34) Potrykus I., Harms, C. T. and Lorz, H. (1979) Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.). Theor. Appl. Genet. 54:  
20 209-214.

(36) Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., Sautter, C. and Schrott, M. (1998) Agricultural Biotechnology, NY:Mercel Dekker Inc. pp. 119-159.

(37) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R. T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors. Method for Plant Molecular Biology, CA: Academic Press Inc. pp.423-436.  
25

(38) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992) Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. Theor. Appl. Genet., 83, 679-683.

- (39) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) Plant Sci. 41:179-183
- (40) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. Transgenic Research 6:329-336.
- 5 (41) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manual B5:1-9. Kluwer Academic Publishers.
- (42) Watson, B., Currier, T.G., Gordon, M.P., Chilton, M.-D. and Nestor, E.W. (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol, 123, 255-264.
- 10 (43) Xiao, L., Ha, S.-B. (1997) Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformants following particle bombardment. Plant Cell reports 16:874-878.
- (44) Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J, 2, 2143-2150.
- 15 (45) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

## 請求の範囲

1. 植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法。
- 5 2. 植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理した後、遺伝子導入処理を行う請求項1記載の方法。
3. 熱処理が33℃～60℃の温度範囲で行われる請求項1又は2記載の方法。
4. 熱処理が35℃～55℃の温度範囲で行われる請求項3記載の方法。
5. 熱処理が37℃～52℃の温度範囲で行われる請求項4記載の方法。
- 10 6. 熱処理が5秒間～24時間の範囲で行われる請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。
7. 37℃～52℃の温度下で1分間～24時間熱処理を行う請求項1又は2記載の方法。
8. 遠心処理が100G～25万Gの遠心加速度の範囲で行われる請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
- 15 9. 遠心処理が500G～20万の遠心加速度の範囲で行われる請求項8記載の方法。
10. 遠心処理が1000G～15万Gの遠心加速度範囲で行われる請求項9記載の方法。
- 20 11. 遠心処理が1秒間～4時間の範囲で行われる請求項1ないし10のいずれか1項に記載の方法。
12. 請求項1ないし11記載の方法を用いることを特徴とする植物の作出方法。
13. 請求項1ないし12記載の方法により作出される植物細胞、植物組織又は植物。
- 25 14. 用いる植物細胞又は植物組織が被子植物由来である請求項1ないし11のいずれか1項に記載の方法。
15. 請求項14記載の方法を用いることを特徴とする被子植物の作出方法。

16. 請求項14または15記載の方法により作出される被子植物細胞、被子植物組織又は被子植物。

17. 用いる植物細胞又は植物組織が単子葉植物由来である請求項14記載の方法。

5 18. 請求項17記載の方法を用いることを特徴とする単子葉植物の作出方法。

19. 請求項17または18記載の方法により作出される単子葉植物細胞、単子葉植物組織又は単子葉植物。

20. 用いる植物細胞又は植物組織がイネ科植物由来である請求項17記載の方法。

10 21. 請求項20記載の方法を用いることを特徴とするイネ科植物の作出方法。

22. 請求項20または21記載の方法により作出されるイネ科植物細胞、イネ科植物組織又はイネ科植物。

23. 用いる植物細胞又は植物組織がイネ、トウモロコシ又はシバである請求項20記載の方法。

15 24. 請求項23記載の方法を用いることを特徴とするイネ又はトウモロコシの作出方法。

25. 請求項23または24記載の方法により作出されるイネ細胞、イネ組織、イネ、トウモロコシ細胞、トウモロコシ組織又はトウモロコシ。

1/4

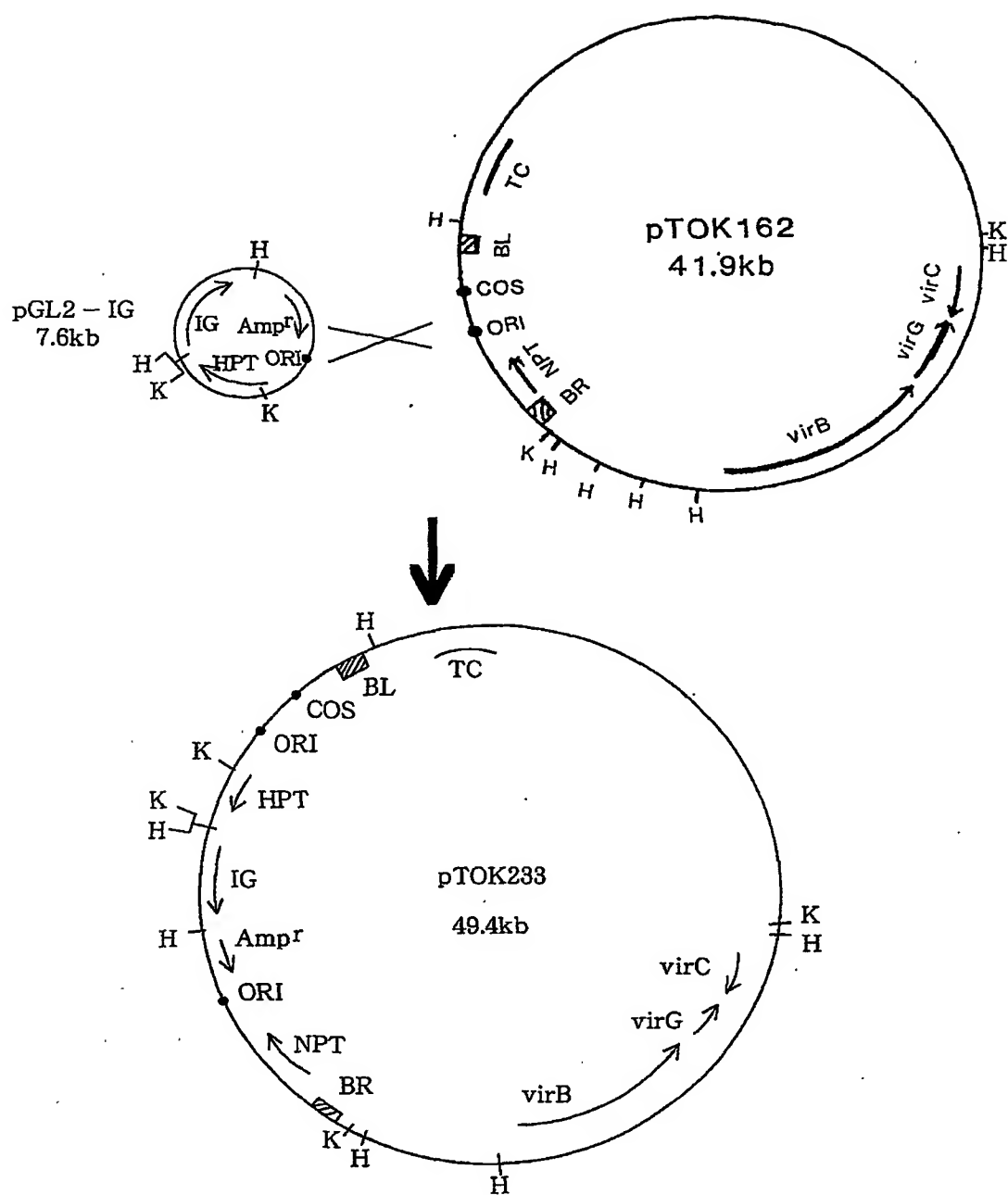


図 1





2/4

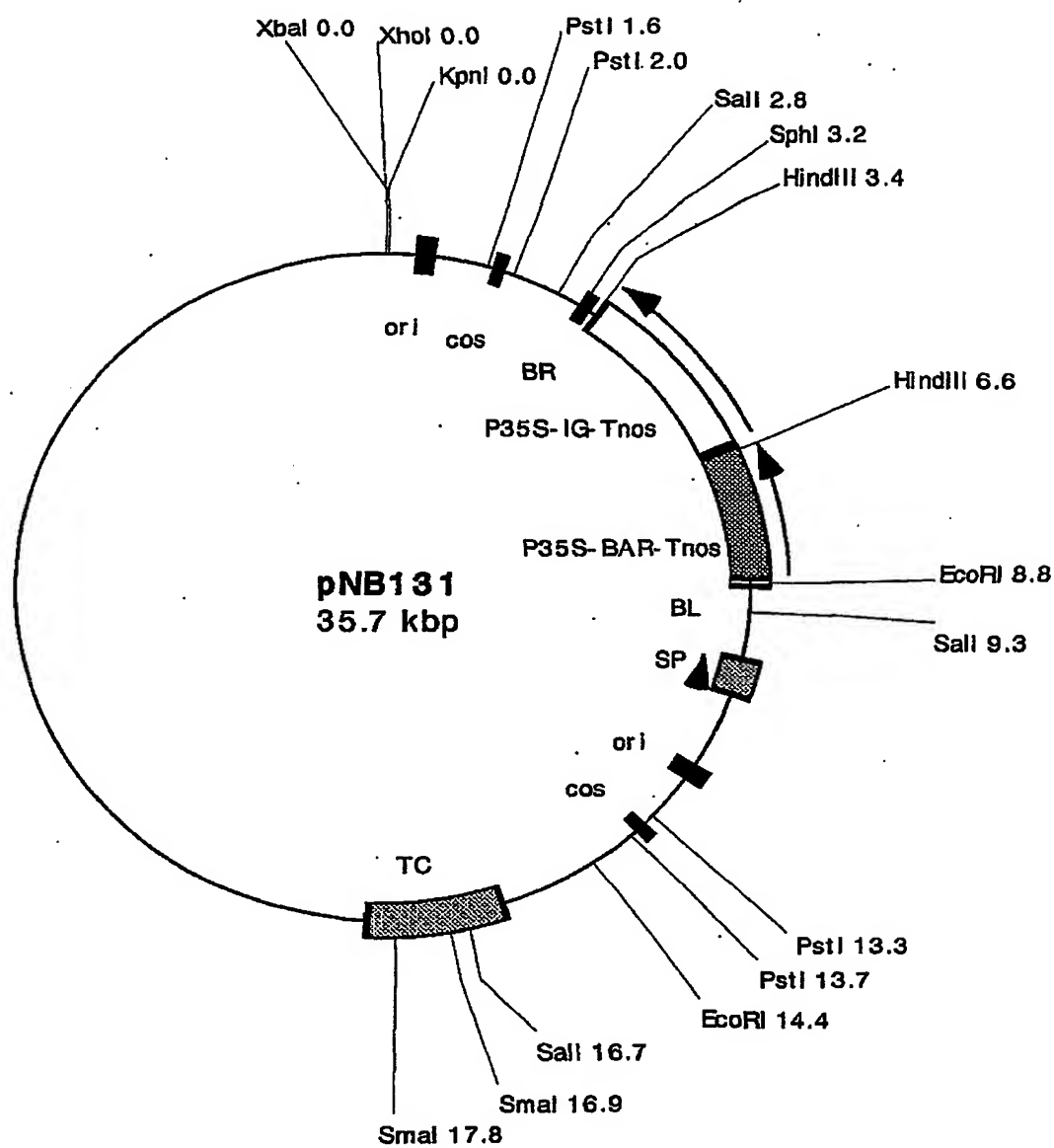
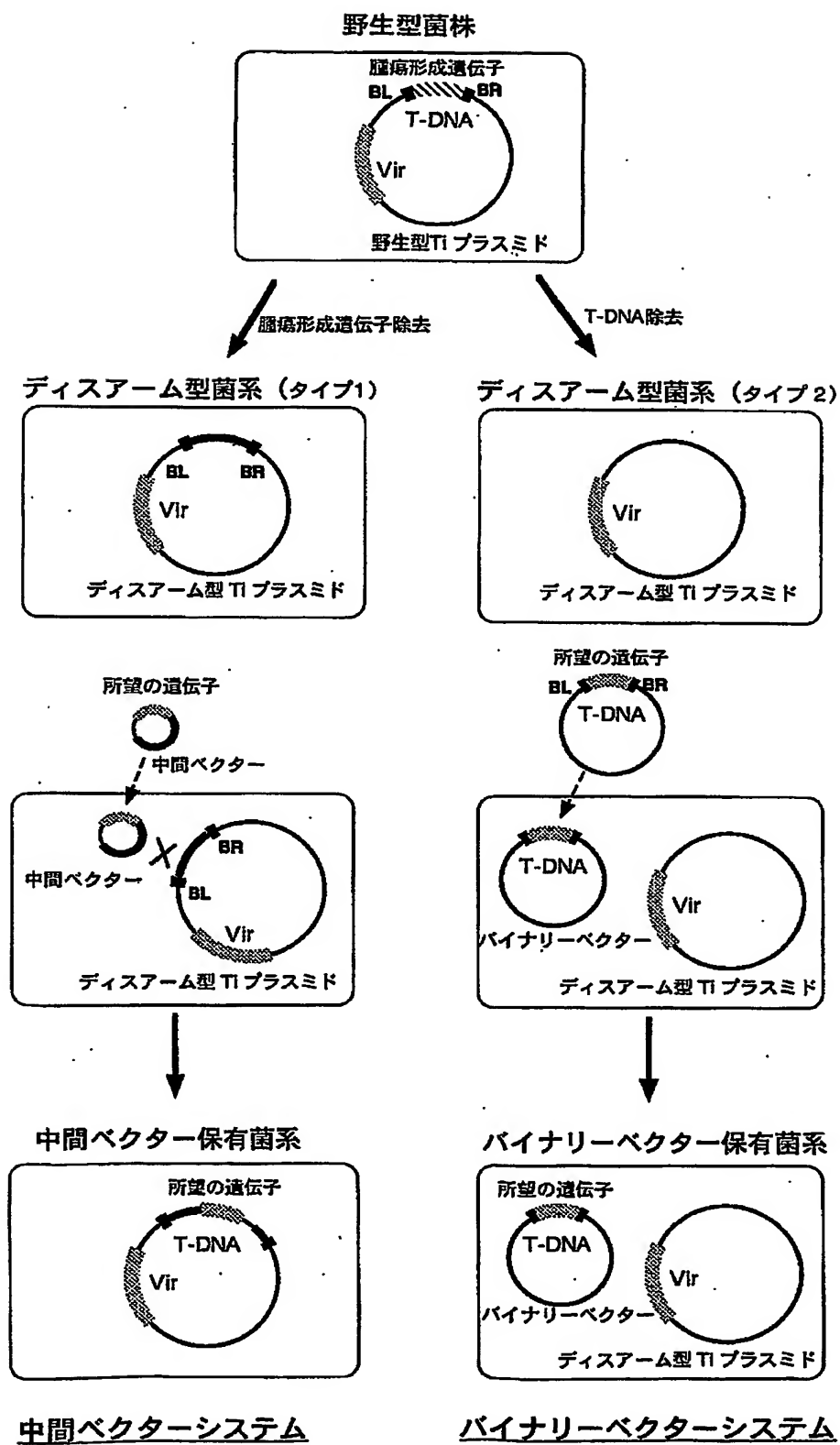


図 2





**图 3**



4/4

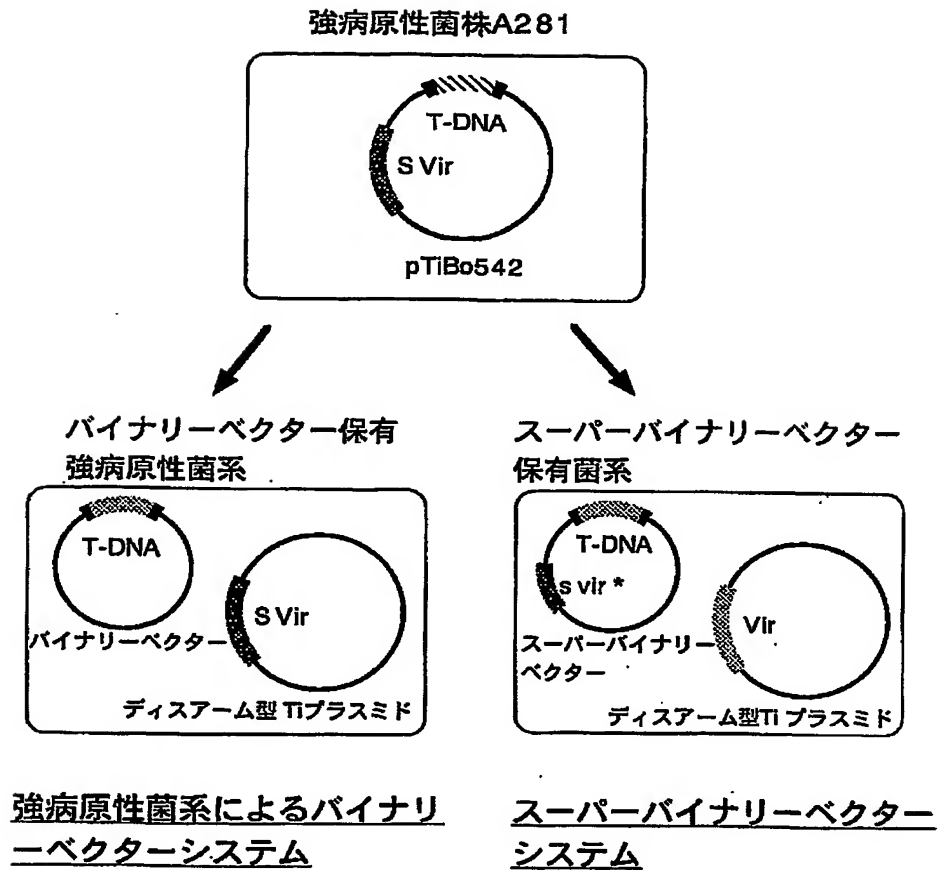


図 4



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05214

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/84, 5/14, A01H 1/00, 5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/00-15/90, A01H 1/00-15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE, JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-179174 A (Hokko Chemical Industry Co., Ltd.), 07 July, 1998 (07.07.98) (Family: none)	1-25
A	WO 00/37663 A2 (THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION, INC.), 29 June, 2000 (29.06.00) & AU 200025943 A	1-25
A	TRICK, H. N. et al., "SAAT: sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation", Transgenic Research, (September, 1997), Vol.6, No.5, pages 329-336	1-25
A	US 5231019 A (CIBA-GEIGY CORPORATION), 27 July, 1993 (27.07.93) & JP, 2000-078926, A & JP, 60-251887, A & GB, 2159173, A & US, 5453367, A & EP, 164575, A1 & EP, 429093, A2	1-25
A	HORSCH, R. B. et al., "A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants", Science, (08 March, 1985), Vol.227, No.4691, pages 1229-1231	1-25



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing  
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means

"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 October, 2000 (17.10.00)

Date of mailing of the international search report  
24 October, 2000 (24.10.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



2

3

4

5



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/84, 5/14, A01H 1/00, 5/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/00-15/90, A01H 1/00-15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-179174, A (北興化学工業株式会社) 7. 7月. 1998 (07. 07. 98) (ファミリーなし)	1-25
A	WO, 00/37663, A2 (THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION, INC.) 29. 6月. 2000 (29. 06. 00) & AU, 200025943, A	1-25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 10. 00

国際調査報告の発送日

24.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名・及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TRICK, H. N. et al. "SAAT:sonication-assisted <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation.", Transgenic Research (Sept., 1997) Vol. 6, No. 5, p. 329-336	1-25
A	US, 5231019, A (CIBA-GEIGY CORPORATION) 27. 7月. 1993 (27. 07. 93) & JP, 2000-078926, A & JP, 60-251887, A & GB, 2159173, A & US, 5453367, A & EP, 164575, A1 & EP, 429093, A2	1-25
A	HORSCH, R. B. et al. "A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants.", Science (Mar. 8, 1985) Vol. 227, No. 4691, p. 1229-1231	1-25